

Université de Sherbrooke

Impact des produits de glycation avancée sur la mécanique
des tissus à base de collagène et de l'endothélium

Par
Yannick Miron

Département de Pharmacologie
Laboratoire du Dr Michel Grandbois

Mémoire présenté à la Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé
En vue de l'obtention du grade de
Maître (M.Sc.) en Pharmacologie

15 septembre 2008

Évalué par
Dr Abdelaziz Amrani, Département de Pédiatrie
Dr Pierre Lavigne, Département de Pharmacologie
Et
Dr Michel Grandbois, Département de Pharmacologie



Library and Archives
Canada

Published Heritage
Branch

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Direction du
Patrimoine de l'édition

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-65621-1
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-65621-1

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

■ ■ ■
Canada

À mes parents Suzanne et Robert
que j'ai probablement négligés, mais jamais oubliés.

Un grand pouvoir implique de grandes responsabilités.
Stan Lee

Impact des produits de glycation avancée sur la mécanique des tissus à base de collagène et de l'endothélium

Par Yannick Miron

Laboratoire de Michel Grandbois, Département de Pharmacologie
Faculté de Médecine et des Sciences de la Santé, Université de Sherbrooke

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de Maître en Pharmacologie

Résumé

Les produits de glycation avancée résultent d'une réaction chimique entre les sucres réducteurs, comme le glucose, avec les protéines et ainsi causer la réticulation des tissus exposés. L'hyperglycémie chronique observée dans la pathologie du diabète expose les tissus à des concentrations de glucose beaucoup plus importantes et amplifie la formation de réticulations. Les tissus vasculaires sont la voie de distribution périphérique du glucose et en sont donc directement exposés. La réticulation du système circulatoire serait la cause de complications majeures associées au diabète. Afin de mieux comprendre l'impact de la réticulation sur les vaisseaux sanguins, nous avons effectué des analyses mécaniques de différents éléments structurels composant les tissus vasculaires comme le collagène et les cellules endothéliales. Nous avons, dans un premier temps, étudié les propriétés mécaniques du collagène dans des expériences mécaniques sur des fibres de collagène. La microscopie à force atomique nous a permis d'identifier des déterminants structuraux majeurs dans la compréhension de la mécanique d'élongation des tissus de collagène. Des expériences mécaniques, suite à une réticulation par les produits de glycation avancée, ont révélé que le collagène réticulé perd une grande partie de sa capacité à dissiper la tension appliquée à sa structure. De plus, dans la phase « Toe », représentant le régime de fonctionnement physiologique et associée à une phase de déformation non linéaire, les fibres de collagène requièrent une dépense d'énergie beaucoup plus importante pour leur déformation. Le collagène réticulé par les produits de glycation avancée s'avère effectivement beaucoup plus rigide et cohésif. Ainsi, dans le contexte d'un tissu vasculaire, la réticulation par les produits de glycation avancée pourrait affecter leurs propriétés mécaniques ce qui aurait des impacts directs sur la rigidité et la compliance des vaisseaux sanguins. Parallèlement, nous avons mesuré l'impact de la réticulation sur la rigidité des cellules endothéliales suite à une exposition chronique à de fortes concentrations de glucose par une méthode de spectroscopie de force dérivée de la microscopie à force atomique. Les cellules endothéliales exposées à une forte concentration de glucose sont beaucoup plus rigides. Cette rigidité accrue serait associée à la formation de réticulations par les produits de glycation avancée. L'hyperglycémie diabétique favorise la réticulation de l'endothélium pour en modifier sa structure et affecter ses fonctions. Nous pensons que les impacts de la réticulation sur ces deux éléments des tissus vasculaires sont des facteurs majeurs de la rigidification des vaisseaux sanguins et de la dysfonction endothéliale. Ces phénomènes sont d'ailleurs clairement identifiés comme des causes directes des complications associées au diabète comme l'hypertension et l'artériosclérose.

Mots clés : Diabète, AGE, réticulation, collagène, cellules endothéliales

Table des matières

Résumé	III
Table des matières	IV
Liste des tableaux	VI
Liste des figures.....	VI
Liste des abréviations	VII
1- Introduction	1
1.1- La glycation.....	1
1.1.1- La chimie des AGEs.....	3
1.2- Le Glucose	6
1.2.1- Le Paradoxe.....	6
1.2.1.1- La régulation glycémique.....	7
1.2.1.2- L'insuline, les Généralités.....	8
1.2.1.3- L'insuline, la Structure et fonction.....	8
1.2.2 Le diabète	10
1.2.2.1- Le Diabète, les Statistiques	10
1.2.2.2- Le Diabète, l'Histoire.....	11
1.2.2.3- Le Diabète, les Généralités	11
1.2.2.4- Le Diabète, le Diagnostique	11
1.2.2.5- Le Diabète de type 1	12
1.2.2.6- Le Diabète de type 2	13
1.2.2.7- Le Diabètes, les Autres	15
1.3- Les complications.....	15
1.3.1- Modifications directes des AGEs et leurs effets	16
1.3.2- Les effets des récepteurs aux AGEs.....	18
1.3.2.1- Les récepteurs aux AGEs autres	18
1.3.2.2- Le récepteur RAGE.....	18
1.3.2.3- Les ligands	19
1.3.2.4- La signalisation de RAGE.....	21
1.3.2.5- Les effets réceptoriels des cellules vasculaires	21
1.3.2.6- RAGE et autres maladies	24
1.4- Traitements pharmacologiques contre les AGEs.....	24
1.4.1- La Cible AGEs	24
1.4.2- La Cible RAGE	25
2.- Problématiques et objectifs	27
2.1- Objectif Spécifique 1.....	27
2.2- Objectif Spécifique 2.....	28
3.- Les modèles expérimentaux	29
3.1- Le collagène de type I	30
3.2- Les cellules endothéliales.....	33
4- Matériel et méthodes.....	34
4.1- L'imagerie par microscopie à force atomique	34
4.1.1- L'Histoire de l'AFM	34
4.1.2- Principes et fonctionnement de l'AFM.....	34
4.1.2.1- Mode contacte	36

4.1.2.2- Mode tapping	36
4.1.3- Avantages et inconvénients.....	36
4.2- La spectroscopie de force.....	38
4.4- Expérience d'étirement	41
4.5- Traitement des tendons au glutaraldéhyde.....	44
4.6- Traitement des tendons au glucose et traitement PTB.....	44
4.7- Caractérisation de la glycation du collagène par immunofluorescence	45
4.8- Préparation des échantillons pour l'imagerie par AFM.....	45
4.9- L'imagerie par AFM des fibres de collagène.....	46
4.10- Culture des cellules endothéliales	46
4.11- Exposition chronique des cellules au glucose.....	47
4.12- Caractérisation de la glycation cellulaire par immunofluorescence	47
4.13- Lysat cellulaire	48
4.14- Électrophorèse des protéines.....	48
4.15- Immunobuvardage de type Western du récepteur RAGE.....	49
4.16- Les expériences de spectroscopie de force sur cellules endothéliales	49
4.17- Préparation des agonistes AGEs	50
4.18- Caractérisation des agonistes AGEs.....	50
4.19- Expériences de stimulation aux AGEs des cellules endothéliales par microscopie à contraste de phase	51
5- Résultats.....	52
5.1- Évaluation globale de la déformation de fibres de collagène sous un stress en fonction de l'élongation.....	52
5.2- Évaluation de l'impact de la réticulation sur la déformation de fibres de collagène en fonction du stress	54
5.3- Évaluation de la vitesse de relaxation	58
5.4- Évaluation de l'énergie de déformation de la région « Toe »	60
5.5- Évaluation globale des paramètres mécaniques de tendons réticulés dans un modèle de réticulation par le glutaraldéhyde.....	62
5.6- Évaluation globale des paramètres mécaniques de tendons réticulés dans un modèle de réticulation par les AGEs <i>in vivo</i> chez des souris diabétiques.....	64
5.7- Évaluation de l'impact de la réticulation des AGEs dans un modèle de traitement au glucose <i>ex vivo</i> sur des tendons	66
5.8- L'imagerie par AFM de fibres de collagène	71
5.9- Réticulation des cellules endothéliales.....	75
5.10- Effet des AGEs sur les cellules endothéliales	77
5.11- Les phénomènes qui affectent les propriétés mécaniques de la membrane.....	81
5.12- L'osmolarité	81
5.13- L'expression du récepteur RAGE	82
5.14- Caractérisation des agonistes	83
5.15- Évaluation des effets des agonistes AGEs sur les cellules endothéliales.....	86
6- Discussion.....	88
7- Conclusion.....	104
Remerciements.....	105
Références	106

Liste des tableaux

Tableau 1 : Liste des différentes hormones qui agissent sur la glycémie	9
Tableau 2 : Tableau des classes de médicaments utilisés dans le traitement du diabète de type 2	14
Tableau 3: Effets directs de la glycation sur divers tissus.....	17
Tableau 4 : Liste des différents ligands pouvant se lier au récepteur RAGE.....	20
Tableau 5 : Dysfonctions des cellules vasculaires causé par la liaison AGE-RAGE	23
Tableau 6 : Différents agents pharmacologiques qui préviennent la formation de AGEs	26

Liste des figures

Figure 1 : Structures du glucose et des acides aminés Lysine et Arginine.....	2
Figure 2 : La réaction de glycation.....	4
Figure 3 : Structures de AGEs communes	5
Figure 4 : Schéma de la structure du récepteur RAGE	20
Figure 5 : La signalisation du récepteur RAGE	22
Figure 6 : Schéma du système vasculaire.....	29
Figure 7 : L'assemblage du collagène.....	32
Figure 8 : Schéma d'un capillaire.....	33
Figure 9 : Schéma d'un balayage AFM sur un tissu de collagène	37
Figure 10 : Schéma d'une expérience de spectroscopie de forces sur cellule.....	40
Figure 11 : Schéma du dynamomètre.....	43
Figure 12 : Courbe de rupture de fibres de collagène.	54
Figure 13 : Mesures des points de rupture des fibres de collagène	56
Figure 14 : Mesures des modules de Young des fibres de collagène	57
Figure 15 : Mesures des vitesses de relaxation de fibres de collagène	59
Figure 16 : Mesures de l'énergie de déformation des fibres de collagène	61
Figure 17 : Histogramme des impacts de la réticulation sur les fibres de collagène.....	63
Figure 18 : Histogramme des impacts de la réticulation par les AGEs dans un modèle <i>in vivo</i> de souris diabétiques.....	65
Figure 19 : Caractérisation de la glycation sur des tendons par immunofluorescence	69
Figure 20 : Mesures de l'énergie de déformation dans un modèle <i>ex vivo</i>	70
Figure 21 : Topographie AFM de fibrilles de collagène	73
Figure 22 : Analyse de la structure des fibrilles par AFM	74
Figure 23 : Mesures du module de Young de cellules endothéliales	76
Figure 24 : Caractérisation des AGEs sur cellules endothéliales par fluorescence.....	79
Figure 25 : Mesures du module de Young des cellules endothéliales exposées au glucose	80
Figure 26 : Expression du récepteur RAGE par les cellules endothéliales	82
Figure 27 : Caractérisation des agonistes par SDS-PAGE.....	84
Figure 28 : Caractérisation des agonistes par autofluorescence des AGEs à 370 nm	85
Figure 29 : Effets des agonistes AGEs sur les cellules endothéliales	87
Figure 30 : Phénomènes de déformation axiale	89
Figure 31 : La réticulation par les AGEs des différents niveaux de structures	96
Figure 32 : Phénomènes pouvant affecter la rigidité membranaire.....	101

Liste des abréviations

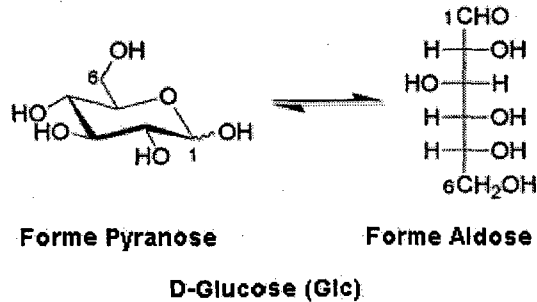
AFGP	1-alkyl-2-firmyl-3,4-glycosyl pyrrole
AFM	Microscopie à force atomique
AGE	Produit de glycation avancée
AGE-BSA	Albumine de sérum bovin modifiée par glycation
AGE-BSA-Lys	Albumine de sérum bovin modifiée par glycation et ajout de lysine
BCA	Acide bicinchoninique
BSA	Albumine de sérum bovin
CEL	N-ε-carboxyéthyl-lysine
CML	N-ε-carboxyméthyl-lysine
DMEM	Dulbecco modified Eagle's minimal essential medium
dnRAGE	Récepteur RAGE dominant négatif
DTT	Dithiothréitol
ECGS	Endotheliale cells growth supplements
ECL	Électrochemiluminescence
FBS	Sérum fœtal bovin
FFI	2-(2-furoyl)-4(5)-furanyl-1 H -imidazole
GLUT4	Transporteur de glucose 4
GOLD	Glyoxal-lysine dimer
HbA1c	Hémoglobine glyquée
HBSS	HEPES-Buffered Salt Solution
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HMGB1	High-mobility group box 1, Amphotérine
HRP	Peroxidase du Raifort
LDL	Lipoprotéine de faible densité
LMWH	Héparine de bas poids moléculaire
MEC	Matrice extracellulaire
MODY	Maturity onset diabetes of the young
MOLD	Methyl-glyoxal-lysine dimmer
NOD	Non Obèse Diabétique
PBS	Phosphate buffer saline, tampon phosphate salin
PTB	Bromure de N-phenacylthiazolium
PVDF	Polyfluorure de vinylidène
RAGE	Receptor for Advance Glycation End products
RFU	Unité de fluorescence relative
ROS	Espèces oxygénées réactives
S100A12	S100 calcium binding protein A12
S100B	S100 calcium binding protein B
SPM	Scanning probe microscopy
sRAGE	Récepteur RAGE soluble
STM	Scanning Tunneling microscopy

1- Introduction

1.1- La glycation

La glycation est une réaction chimique non contrôlée entre les sucres réducteurs et les amines primaires pour former les produits de glycation avancée. Il s'agit d'une réaction assez lente dont les produits peuvent s'accumuler dans le temps. Dans un organisme comme l'homme, le sucre réducteur le plus abondant est le glucose (Figure 1a). Les amines primaires sont abondamment présentes sur les acides aminés qui composent les protéines. Deux acides aminés sont particulièrement susceptibles à réagir avec les sucres réducteurs : la lysine et l'arginine qui possèdent une amine primaire sur leur chaîne latérale puisque les chaînes latérales ne sont pas impliquées dans la liaison peptidique lors de la formation des protéines (Figure 1b). Il est à noter que la réaction de glycation est par contre beaucoup moins favorisée sur l'arginine puisque son amine primaire est en résonance avec son amine secondaire. La glycation est aussi parfois appelée glycosylation non enzymatique. Le processus de la glycosylation est une réaction enzymatique ajoutant un polysaccharide à une protéine lors de la maturation des protéines dans le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Cette modification post-traductionnelle est contrôlée par les enzymes et la structure des protéines (motifs de glycosylation), mais ne sera pas discutée dans ce mémoire. La glycation forme des produits de glycation avancée (AGEs) qui peuvent causer des changements structuraux importants sur les protéines comme la réticulation.

A



B

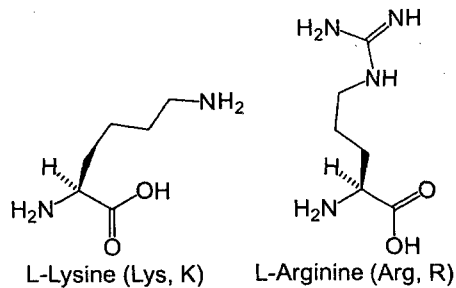


Figure 1 : Structures du glucose et des acides aminés Lysine et Arginine

A) Structure du glucose sous sa forme pyranose en solution et sa forme aldose réductrice. B) Les acides aminés Lysine et Arginine. Ces acides aminés possèdent une amine primaire sur leur chaîne latérale ce qui les rendent susceptibles à une réaction de glycation.

1.1.1- La chimie des AGEs

D'un point de vue chimique, la glycation s'appelle la réaction de Maillard (MAILLARD *et al.*, 1912). Historiquement, elle décrivait la pigmentation lors de la cuisson (caramélisation) et la conservation des aliments (Figure 2). Elle se passe entre la forme aldose réductrice du glucose et les amines primaires pour former une base de Schiff. Suite à cette réaction la base de Schiff peut subir un réarrangement d'Amadori pour former un produit d'Amadori (AMADORI, 1925). Ces produits d'Amadori s'accumulent dans les protéines et peuvent par la suite réagir avec une seconde amine primaire pour former une réticulation (crosslink) entre deux acides aminés ou deux protéines distinctes. Le produit d'Amadori peut également se décomposer en α -oxoaldéhydes comme le glyoxale, le méthylglyoxale et le 3-deoxyglucosone. Ces α -oxoaldéhydes peuvent eux aussi réagir avec les acides aminés pour former des AGEs. Ces produits sont grandement favorisés par des conditions oxydantes et les métaux de transition et sont aussi appelés produits de glycoxydation avancée (ULRICH *et al.*, 2001). De plus le glyoxale et le méthylglyoxale sont des métabolites de la glycolyse ce qui fait du glucose une source directe de ces réactifs causant des AGEs (BROWNLEE, 2001). Une liste des principales structures de AGEs est illustrée à la Figure 3. Certains de ces AGEs comme la pentosidine émettent de la fluorescence à 440 nm lorsque qu'ils sont excités à une longueur d'onde de 370 nm (ULRICH *et al.*, 2001).

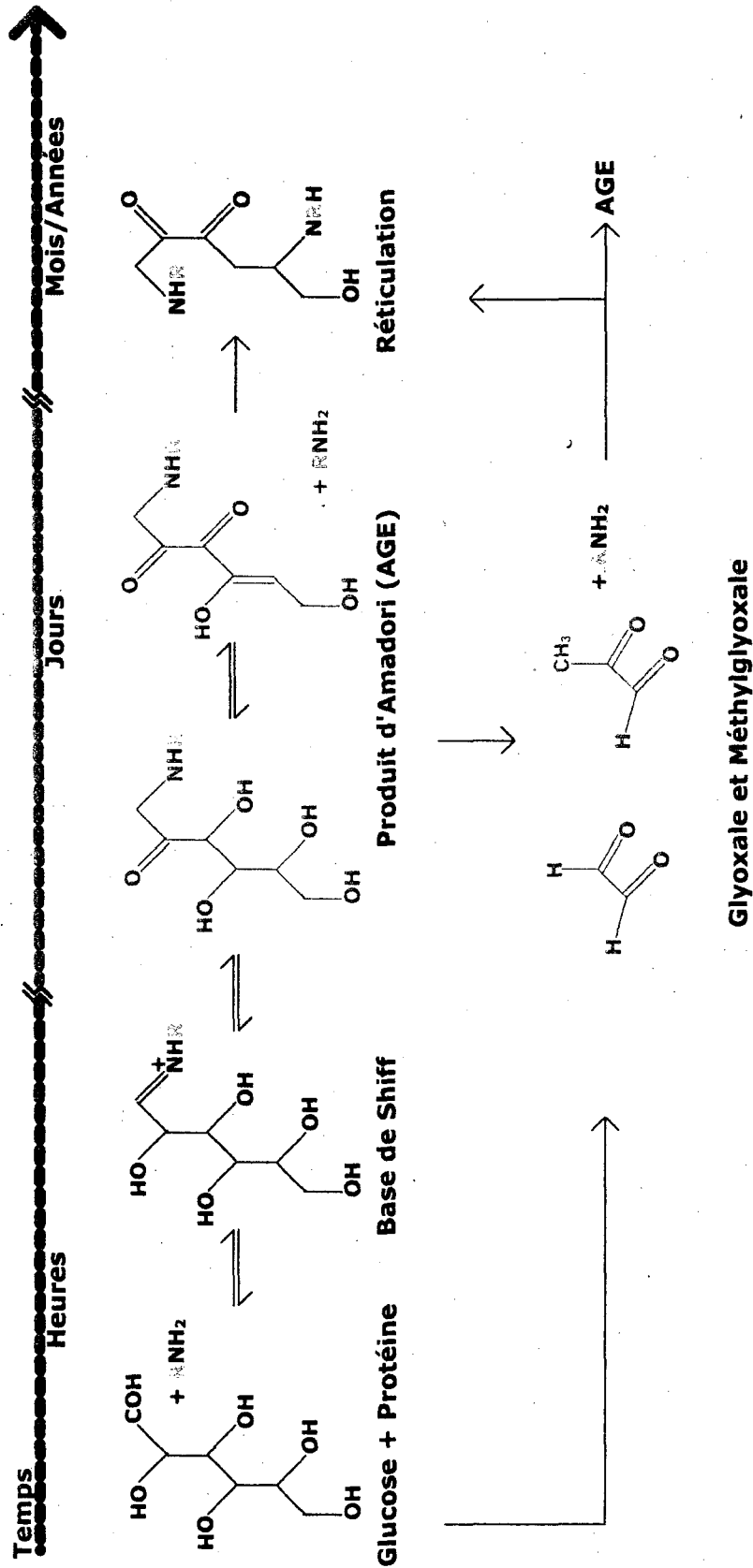


Figure 1 : La réaction de glycation

La réaction de glycation de produit entre les sucres réducteurs comme le glucose et les amines primaires présentes sur les acides aminés. La réaction forme une base de Schiff qui subit un réarrangement d'Amadori et forme à long terme de la réticulation entre les protéines. Les métabolites du glucose comme le glyoxale et le méthylglyoxale peuvent aussi former des AGEs. La réaction est assez lente et les produits de glycation s'accumulent à long terme, mais leur formation est amplifiée par l'hyperglycémie diabétique.

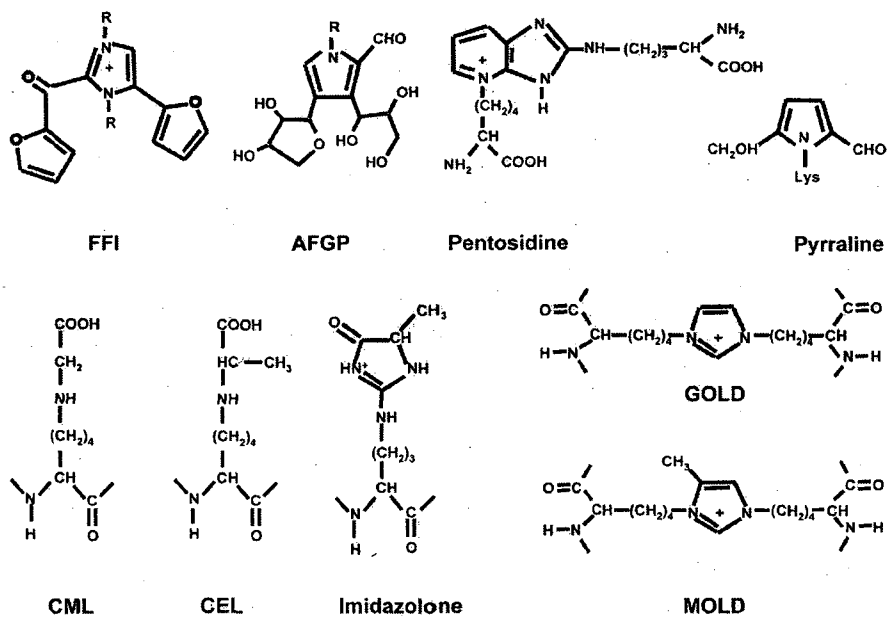


Figure 3 : Structures de AGEs communes

Structure de différents AGEs connus selon Basta *et al.* Certaines de ces structures forment des réticulations entre les protéines. La forme prédominante dans l'organisme est le CML. Notez que certaines structures comme MOLD, GOLD et la pentosidine possèdent une auto fluorescence lorsqu'elles sont excitées à 370 nm.

1.2- Le Glucose

1.2.1- Le Paradoxe

Le glucose est l'élément clé de la glycation tout en étant un élément essentiel à la survie du règne animal. Il s'agit d'un composé organique ($C_6H_{12}O_6$) et nécessaire comme source d'énergie à l'organisme humain. De par son hydrolyse, le corps est en mesure de se procurer l'énergie nécessaire au fonctionnement de la respiration cellulaire. Le processus commence dans la digestion, par l'hydrolyse enzymatique de sucres plus complexes (polysaccharides) puis son absorption pour être distribué à travers le corps par le sang. Il est ensuite capté par les cellules selon leurs besoins énergétiques et hydrolysé par diverses enzymes dans les réactions de glycolyse, le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire. Ultimement, le glucose mène à la production d'ATP qui est la source d'énergie raffiné utilisée par les divers processus cellulaires comme le transport actif, la biosynthèse de composantes biologiques telles les protéines, la motilité et la division cellulaire. D'un point de vue évolutif, le glucose est le meilleur choix comme molécule énergétique puisqu'il est le sucre réducteur le moins réactif probablement dû à sa forme pyranose prédominante en solution aqueuse (BUNN *et al.*, 1981). Bien qu'il soit peu réactif avec les amines primaires, son abondance surtout dans des cas d'hyperglycémie le rend inévitablement impliqué dans la réaction de glycation. L'évolution a aussi favorisé l'organisme à absorber le plus efficacement possible le glucose afin de palier aux périodes creuses comme les famines. Paradoxalement, avec l'industrialisation de l'alimentation et les changements de mode de vie du dernier siècle, l'organisme reçoit des quantités de glucose plus que nécessaires à son bon fonctionnement rendant le glucose,

pourtant source d'énergie, un poison pour les protéines et les cellules lorsqu'il est en trop grande quantité par la formation de produits de glycation avancée (AGEs).

1.2.1.1- La régulation glycémique

L'homéostasie glycémique est primordiale dans le maintien des fonctions physiologique. Puisque l'absorption de nutriments se fait de façon intermittente, l'organisme a développé un système de stockage et de redistribution du glucose en cas de besoin pour maintenir une concentration suffisante aux besoins du corps. L'organisme régule normalement la concentration de glucose entre 4,4 et 6,1 mM. Lorsque la concentration sanguine est inférieure, il s'agit d'un état d'hypoglycémie et lorsque la concentration est supérieure on parle d'hyperglycémie. Bien qu'un état hypoglycémique prolongé puisse causer la mort, l'hypoglycémie n'est généralement pas associée à une maladie. L'hyperglycémie chronique, quant à elle, est associée au diabète sucré, ou mellitus, et à diverses complications qui en découlent. L'hyperglycémie favorise d'ailleurs beaucoup les processus de glycation des protéines. Ces AGEs ont de multiples effets directs et indirects sur l'organisme pouvant être des facteurs pathologiques causants plusieurs complications reliées au diabète. Les AGEs sont responsables de changements physicochimiques de diverses protéines et entraîne un fonctionnement anormal de divers types cellulaires (BASTA *et al.*, 2004). Dans un cas normal, afin d'éviter l'hyperglycémie, la stratégie de l'organisme est la régulation de la glycémie par un système de stockage hépatique et périphérique du glucose contrôlé par une hormone ; l'insuline.

1.2.1.2- L'insuline, les Généralités

Bien que controversé, l'insuline aurait été découverte par Nicolae Paulescu avant la Première Guerre Mondiale, mais seulement publiée après celle-ci (PAULESCU, 1921). Ce sont Frederick Grant Banting (BANTING *et al.*, 1922) et John Macleod qui furent crédités de la découverte par le Prix Nobel de Physiologie en 1923 suite à leurs travaux sur l'isolation et la première utilisation clinique de l'insuline chez l'humain effectués avec leurs collaborateurs Charles Best et James Collip. Peu de temps après leur Prix Nobel, en 1923, la compagnie pharmaceutique Eli Lilly offre son aide et est en mesure de produire de l'insuline purifiée à grande échelle très rapidement.

Trois autres Prix Nobel ont été attribués suite à des travaux sur cette hormone. Elle est la première protéine à avoir été séquencée par Frederick Sanger qui reçut le Prix Nobel de Chimie en 1958. Dorothy Crowfoot Hodgkin reçut le Prix Nobel de Chimie en 1964 pour le développement de la cristallographie suite en grande partie à ses travaux par diffraction aux rayons X sur la conformation de l'insuline. Finalement, Rosalyn Sussman Yalow reçut le Prix Nobel de Médecine en 1977 pour le développement du radio-immuno essai des hormones peptidiques et principalement de l'insuline.

1.2.1.3- L'insuline, la Structure et fonction

L'insuline est produite par les cellules β du pancréas. Il s'agit d'une hormone peptidique formée de deux chaînes polypeptidiques reliées par des ponts disulfures. Elle est stockée dans des vésicules et généralement sécrétée suite à une augmentation sanguine de glucose. Dans un cas normal, lors d'une hyperglycémie, suite à un repas par exemple, l'insuline sécrétée agit principalement au niveau du foie, des cellules adipeuses et

musculaires. Les effets sont de favoriser l'entrée du glucose dans ces tissus entre autre par la translocation du transporteur du glucose GLUT4 à la membrane et de moduler l'activité de diverses enzymes anaboliques tel les enzymes impliquées dans la synthèse du glycogène. La résultante est donc une diminution sanguine du glucose par une augmentation du stockage hépatique et périphérique. L'insuline est la seule hormone hypoglycémiante connue à ce jour tel qu'indiqué dans le Tableau 1. Un dysfonctionnement dans sa production, sa sécrétion ou sa signalisation peut produire un état hyperglycémique chronique qui est associé au diabète mellitus.

Tableau 1 : Liste des différentes hormones qui agissent sur la glycémie
(Inspiré de MARIEB 1998)

Hormone	Tissu d'origine	Effets Métaboliques	Effets sur la glycémie
Insuline	Cellules β pancréas	Augmente l'entrée du glucose dans les cellules, augmente le stockage de glucose, augmente les voies anabolique et inhibe les voies cataboliques	Diminution
Glucagon	Cellules α pancréas	Augmente la glycogénolyse et la néoglucogenèse	Élévation
Somatostatine	Cellules D pancréas	Inhibe la sécrétion d'Insuline, de glucagon, de GH, d'ACTH de gastrine et de sécrétine	Élévation
Épinéphrine	Médullosurrénale	Augmente la glycogénolyse et la relâche acides gras du tissu adipeux	Élévation
Cortisol	Corticosurrénale	Augmente la néoglucogenèse et antagonise l'insuline	Élévation
ACTH	Adénohypophyse	Augmente la relâche de cortisol et la relâche acides gras du tissu adipeux	Élévation
GH	Adénohypophyse	Antagonise l'insuline	Élévation
Thyroxine	Thyroïde	Augmente la glycogénolyse et l'absorption du glucose	Élévation

1.2.2 Le diabète

Lorsque l'organisme n'est plus en mesure de contrôler la concentration de glucose disponible dans le sang, on retrouve une hyperglycémie maintenue de façon chronique : le diabète mellitus ou sucré. Le diabète est donc un désordre métabolique chronique qui affecte l'homéostasie glycémique et le bon fonctionnement du système hormonal de l'insuline.

1.2.2.1- Le Diabète, les Statistiques

Notre société est de plus en plus affectée par le diabète. De fait, depuis quelques années, l'Organisation Mondiale de la Santé considère le diabète comme une épidémie globale avec un total de 171 millions de personnes affectées par cette maladie en 2000. La progression de la maladie est très élevée même dans les économies émergentes comme la Chine et dans les pays en développement ou en voie de développement.

Au États-Unis, l'Association Américaine du Diabète a enregistré une augmentation de 13,5 % de cas de diabète de 2005 à 2007 atteignant tout près de 24 millions d'Américains soit 8 % de la population et estime que 25 % de ces cas de diabète ne sont même pas diagnostiqués. De plus 57 millions d'américain sont diagnostiqués prédiabétiques et présentent des risques cardiovasculaires accrus.

Au Canada, c'est plus de 2 millions de canadiens qui sont atteints du diabète et les coûts du système de santé pour traiter le diabète et les complications associées pourraient atteindre près de 16 milliards \$ par année en 2010.

1.2.2.2- Le Diabète, l'Histoire

On connaît le diabète mellitus (diabète sucré) depuis des siècles. Le mot diabète est d'ailleurs dérivé du grec et signifie «traversé par l'eau» (urine et soif excessive) et mellitus provient du latin et signifie « miel » (urine sucrée). Les symptômes sont en effet décrits dans la Grèce, l'Égypte, la Chine, l'Inde et la Perse antique. Ils sont normalement une polyurie, une soif excessive (polydipsie) accompagnée parfois d'une faim excessive (polyphagie), une possible déshydratation et une excrétion de glucose par voie urinaire (glycosurie).

1.2.2.3- Le Diabète, les Généralités

Évidemment, ces symptômes sont principalement causés par le débalancement osmotique produit par la grande concentration de glucose. En effet, lorsque la concentration de glucose dépasse la capacité des reins à le réabsorber activement au niveau du tubule proximal (9 à 10 mM), le surplus de glucose élève l'osmolarité de l'urine empêchant les reins de réabsorber l'eau et augmente le volume d'urine.

1.2.2.4- Le Diabète, le Diagnostique

De façon plus clinique, la glycémie normale se situe entre 4,4 et 6,1 mM. Les critères de diagnostique du diabète sont : une glycémie au hasard supérieur ou égale à 11,1 mM et/ou une glycémie à jeun supérieur ou égale à 7 mM et/ou une glycémie supérieur ou égale 11,1 mM deux heures après surcharge orale de glucose produite avec 75 g de sucre. Il existe différents types de diabètes mellitus. Ceux-ci sont divisés sur la base de l'hyperglycémie résultant d'un défaut dans la sécrétion de l'insuline, de l'action de

l'insuline ou les deux (ANONYM 2003). Les deux principaux types de diabète mellitus sont le diabète de type 1 et le diabète de type 2. Par ailleurs, une glycémie au dessous des limites inférieurs du diabète, mais au-delà des limites supérieurs normales est considérée comme un état pré diabétique propice au développement du diabète de type 2 et comportant des risques de complications. Ceci semble moins bien défini pour le diagnostic avant l'apparition du diabète de type 1, mais l'un des signaux de diagnostic du diabète de type 1 est l'apparition de corps cétoniques dans les urines. Finalement, dans tout les cas de diabète, il est également possible de doser la glycation de l'hémoglobine ce qui reflète la glycémie des 2 à 3 derniers mois. En effet, une glycation supérieur à 7% de l'hémoglobine (HbA1c) représente un mauvais contrôle de la glycémie et est associée à l'augmentation des risques de complications associées au diabète.

1.2.2.5- Le Diabète de type 1

Le diabète type 1 est aussi connu sous le nom de diabète juvénile puisque cette maladie se développe souvent chez l'enfant, l'adolescent et le jeune adulte. Il est aussi insulino-dépendant puisqu'il se caractérise normalement par une incapacité à produire de l'insuline et représente environ 10 % des cas de diabète mellitus. Les causes sont parfois idiopathiques, mais découlent souvent d'une réaction auto-immune entraînant la destruction des cellules β du pancréas. Le diagnostic est souvent fait suite à une autre infection, sans nécessairement être la cause de la maladie. Il est souvent accompagné d'une perte de poids musculaire et adipeuse et une asthénie (fatigue physique, psychologique et perte de libido). Les complications directes sont la déshydratation et l'acidocétose. Le traitement est généralement l'administration d'insuline exogène pour

combler au manque physiologique d'insuline. Il existe plusieurs types d'insulines véhiculés par différentes voies d'administration développées depuis le début du 20^e siècle. De plus, une administration contrôlée de trois fois et plus par jour démontre un effet énorme sur le développement des complications. (The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, 1993)

1.2.2.6- Le Diabète de type 2

Le diabète de type 2 est aussi appelé diabète de l'âge mûr puisque environ 20 % des personnes âgées de 65 et plus souffrent de ce type de diabète. Il est par contre en progression dans tous les groupes d'âge. Il est non insulino-dépendant, mais plutôt insulino-résistant. En effet, c'est la réponse des cellules cibles de l'insuline qui est défaillante et ne régule plus la glycémie de façon aussi efficace laissant une concentration de glucose anormalement élevée de façon chronique. Le mécanisme menant à la résistance à l'insuline est généralement attribué à la production d'hormones adipocriques par les adipocytes augmentant de façon générale un état inflammatoire par la sécrétion de médiateurs comme le $\text{TNF}\alpha$, IL-1 et IL-6. Cet état inflammatoire inhibe la réponse à l'insuline (FULOP *et al.*, 2006). De plus, puisque l'absorption hépatique et périphérique est inhibée, l'hyperglycémie résiduelle entraîne une surproduction d'insuline qui peut causer à long terme une dégénérescence des cellules β . Les causes du diabète de type 2 sont nombreuses et souvent liées à l'environnement et au style de vie. Il y a tout d'abord une forte corrélation de ce type de diabète avec l'obésité. En effet, 50 à 60 % des diabétiques type 2 sont obèses. De plus, il y a d'importants facteurs génétiques comme les antécédents familiaux ou l'origine ethnique (le peuple des premières nations par

exemple). La maladie présente souvent très peu de symptômes durant plusieurs années réduisant considérablement les chances de diagnostique précoce. Les traitements pour le diabète de type 2 sont nombreux, mais généralement un changement de diète, de l'activité physique et une perte de poids sont des étapes clés du contrôle de la glycémie. Les agents pharmacologiques pour traiter le diabète les plus souvent utilisés sont les biguanides comme la metformine en combinaison avec les sulfonylurées. Le mécanisme d'action de la metformine n'est pas encore totalement connu, mais diminuerait des voies cataboliques du glycogène hépatique et l'absorption du glucose par le système gastro-intestinal puis favoriserait l'utilisation périphérique du glucose. Les sulfonylurées se lient aux canaux potassiques ATP dépendants des cellules β du pancréas et favorise la dépolarisation qui mène à la sécrétion de l'insuline. Il existe d'autres classes de médicaments utilisées dans le traitement du diabète de type 2 comme l'indique le Tableau 2. Finalement, dans des cas d'obésité grave et échec des autres traitements, il est possible de procéder à des interventions chirurgicales comme une déviation gastrique.

Tableau 2 : Tableau des classes de médicaments utilisés dans le traitement du diabète de type 2

(SKAMAGAS *et al.*, 2008)

Classes de médicaments	Mode d'action
Metformine	Inhibition de la néoglucogenèse hépatique et augmentation de l'utilisation du glucose périphérique
Sulfonylurées	Stimulation de la sécrétion d'insuline par liaison aux canaux K^+ ATP dépendants
Thiazolidinediones	Liaison à PPAR γ stimule certains gènes qui atténuent la résistance à l'insuline
Inhibiteurs α -Glucosidase	Saccharides inhibiteurs compétitifs de l'enzymes α -glucosidase
Meglitinides	Stimulation de la sécrétion d'insuline par liaison aux canaux K^+ ATP dépendants
Peptides Glucagon-like	Augmentent la production et la sécrétion d'insuline, inhibe la sécrétion de glucagon, inhibe la vidange gastrique et augmente la satiété

1.2.2.7- Le Diabète, les Autres

Diabète gestationnel

Ce type de diabète survient temporairement durant la grossesse et disparaît après l'accouchement. Les causes exactes ne sont pas connues, mais les hormones de grossesses ainsi que l'augmentation des tissus adipeux pourraient causer une résistance à l'insuline.

Diabètes génétiques

Il existe un type de diabète rare, le diabète MODY. Ce sont des diabètes génétiques autosomiques dominants. Les mieux connues sont le MODY 2 et le MODY 3. Le MODY 2 affecte le gène de la glucokinase produisant une enzyme moins sensible au glucose dans le foie et les cellules β et ne déclenche pas la sécrétion de l'insuline normalement. Le MODY 3 affecte le gène du facteur de transcription hépatique 1α important dans la différenciation des cellules β .

1.3- Les complications

L'hyperglycémie chronique dans les cas de diabète entraîne de graves complications à long terme. En effet, le diabète a été décelé comme facteur de risques majeurs pour diverses complications touchant divers tissus et organes affectant particulièrement la micro et macro-circulation tel l'athérosclérose (ARONSON *et al.*, 2002; BASTA *et al.*, 2004; GOLDIN *et al.*, 2006; ZIEMAN *et al.*, 2004), l'hypertension (REDDY, 2004a), la rétinopathie (STITT *et al.*, 2005; YAMAGISHI *et al.*, 2008), la néphropathie (SUZUKI *et al.*, 2006; YAMAMOTO *et al.*, 2005), l'impotence (MUSICKI *et al.*, 2007). Les complications incluent aussi la neuropathie (SUGIMOTO *et al.*, 2008) et les cataractes

(STITT *et al.*, 2005). Dans toutes ces complications, un élément a été identifié comme étant la source des dysfonctions : la glycation des protéines.

1.3.1- Modifications directes des AGEs et leurs effets

La glycation affecte directement la structure et la fonction des protéines et est un facteur important dans le développement des complications associées au diabète. Par exemple, les protéines structurelles comme le collagène font parties de la tunique externe des parois vasculaires. Puisque ces protéines ont une longue durée de vie, elles sont particulièrement exposées longtemps au glucose environnant causant la réticulation de sa structure. La glycation affecte l'élasticité du collagène (REDDY *et al.*, 2002; REDDY, 2004b) et augmentant entre autre la rigidité vasculaire (BAILEY, 2001; BROWNLEE *et al.*, 1986; REDDY, 2004a; SELL *et al.*, 1989; SIMS *et al.*, 1996). De plus, la glycation réduit la susceptibilité des protéines matricielles à être dégradées par les enzymes comme les métalloprotéinases (GREENWALD, 2007) ce qui peut causer une accumulation de matrice dans les tissus et en augmenter le volume comme dans certain cas d'hypertrophie ventriculaire (BIRCHALL *et al.*, 2001; HERRMANN *et al.*, 2003). La glycation des protéines du cristallin le rend plus opaque et cause des cataractes (MONNIER *et al.*, 1983; RANJAN *et al.*, 2006). Le Tableau 3 énumère une série de modifications directes des AGEs ainsi que leurs effets.

Tableau 1: Effets directs de la glycation sur divers tissus
(Inspiré de Basta *et al.* 2004)

Cibles	Mécanismes	Changements Physiologiques	Effets Cliniques	Références
Tissu conjonctif et Matrice extracellulaire	↑ Réticulation du collagène	↑ Rigidité vasculaire	Hypertension	Bailey 2001, Brownlee 1986, Sims 1996, Sell 1989
	↑ Réticulation de l'élastine	↑ Rigidité vasculaire	A déterminé <i>In vivo</i>	Konova 2004, Winlove 1996, Greenwald, 2007
LDL	↓ Dégradation du collagène	↑ Volume tissulaire	Hypertrophie	Sell 1989, Verzijl 2000
	↑ Synthèse de matrice extracellulaire	↓ Effets paracrines hypotenseurs	Hypertension	Sims 1996, Brownlee 1988
	↓ Oxyde Nitrique, "quech" MEC	↓ Lumière vasculaire	Sténose	Bucala 1991
	↑ Réticulation de protéines solubles sur la MEC	↑ Trappage LDL par la MEC	Athérosclérose	Bailey 2001, Brownlee 1983, Viassara 1994
	↑ Réticulation LDL avec MEC	↓ Croissance des neurites	Neuropathie	Brownlee 1985, Viassara 1996, Meng 1998
	↑ AGE-Laminine			Federoff 1993
Peptide β -amyloïde	↑ AGE-LDL	↓ Entré cellulaire de LDL	Athérosclérose	Bucala 1995, Bucala, 1994, Steinbrecher 1984
	↓ Reconnaissance par Recepteur LDL	↑ Durée de vie et quantité AGE-LDL		
	↑ Entré AGE-LDL par récepteur scavenger des cellules monocytaires et musculaires lisses	↑ Trappage LDL par la MEC		Witztum 1991
Cristallin	↑ AGE- β -amyloïde	↑ Formation de plaques	Alzheimer	Sasaki 1998, Vitek 1994
	↑ Réticulation Peptide β -amyloïde	↑ Stabilité des plaques		
Érythrocyte	↑ AGE- α -, β - et γ -Cristallin	↑ Opacité du cristallin	Cataracte	Ranjan 2006, Monnier 1983
Anticorps	↑ Réticulation sur les Érythrocyte	Changement morphologique des RBC	Sicklénie	Saika S 2005
Neurones	↑ Glycation de l'hémoglobine HbA1c	↓ Transport de l'oxygène		James 2004
	↑ Réticulation et glycation des IgG	↑ Inflammation et anticorp anti-AGEIgG	Arthrite rhumatoïde	Newkirk 2003
	↑ Phagocytose des AGE-myéline	↑ Démyélinisation	Neuropathie	Sugimoto 2008

1.3.2- Les effets des récepteurs aux AGEs

Les complexes AGEs sont également reconnus par des récepteurs et activent différentes signalisations qui perturbent l'organisme.

1.3.2.1- Les récepteurs aux AGEs autres

Il existe plusieurs récepteurs qui lient les AGEs (GOLDIN *et al.*, 2006), AGE-R1 (Oligosaccharyl transférase-48), AGE-R2 (80K-H phosphoprotéine), AGE-R3 (galectine-3) et différents récepteurs de types scavengers. Par contre, il semble qu'aucun de ces récepteurs n'induit de signalisation cellulaire suite à la liaison avec un ligand AGE. (BUCCIARELLI *et al.*, 2002; STITT *et al.*, 1997) Ils ont plutôt un rôle de clairance et de détoxification des AGE (BUCCIARELLI *et al.*, 2002).

1.3.2.2- Le récepteur RAGE

Un récepteur est par contre maintenant bien identifié comme un important joueur dans plusieurs complications reliées au diabète : le récepteur RAGE. Chez l'homme, le gène du récepteur RAGE est situé sur le chromosome 6 dans la région du complexe d'histocompatibilité majeur classe II et classe III et contient 11 exons et 10 introns (SUGAYA *et al.*, 1994). La région promotrice du gène comprend un élément de réponse à l'interferon- γ , un motif de liaison à l'ADN pour le facteur nucléaire IL-6 et finalement un site NF- κ B qui contrôle son expression cellulaire (LI *et al.*, 1997). Il existe pas moins de 6 isoformes générés par épissage alternatif de l'ARNm identifiés dont 3 majeurs : la forme complète, une forme soluble et une forme dominante négative (DING *et al.*, 2005). Le poids moléculaire du récepteur complet est environ 46 kDa (BASTA *et al.*, 2002). Il

s'agit d'un récepteur de type immunoglobuline (GOLDIN *et al.*, 2006; NEEPER *et al.*, 1992; SCHMIDT *et al.*, 1992) et compte 5 domaines. Le domaine type V (variable), important pour la reconnaissance du ligand (KISLINGER *et al.*, 1999; SCHMIDT *et al.*, 2001; YAN *et al.*, 2003), est l'extrémité N-terminal du récepteur suivit de deux domaines type C (constant) forment la queue extracellulaire du récepteur comptant 332 acides aminés. Le récepteur n'a qu'un seul domaine transmembranaire de 19 acides aminés qui sert d'ancrage à la membrane. Finalement, une queue cytoplasmique de 43 acides aminés hautement chargés C-terminale est absolument nécessaire à la signalisation (SCHMIDT *et al.*, 2001). Il est possible que le récepteur forme des oligomères suite à la liaison du ligand (DATTILO *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 1994).

1.3.2.3-Les ligands

En plus des différents AGE, le récepteur RAGE interagit avec plusieurs ligands comme les S100/calgranulines, HMG-1 et les peptides β -amyloïdes. Il semble que la liaison de ces différents ligands pourrait être associée à des signalisations distinctes, mais varie beaucoup en fonction du type cellulaire (DING *et al.*, 2005). Pour ce qui a trait au différents AGEs, il semble que la N- ϵ -carboxyméthyl-lysine (CML Figure 3) soit la forme prédominante se liant à RAGE *in vivo* (IKEDA *et al.*, 1996; REDDY *et al.*, 1995).

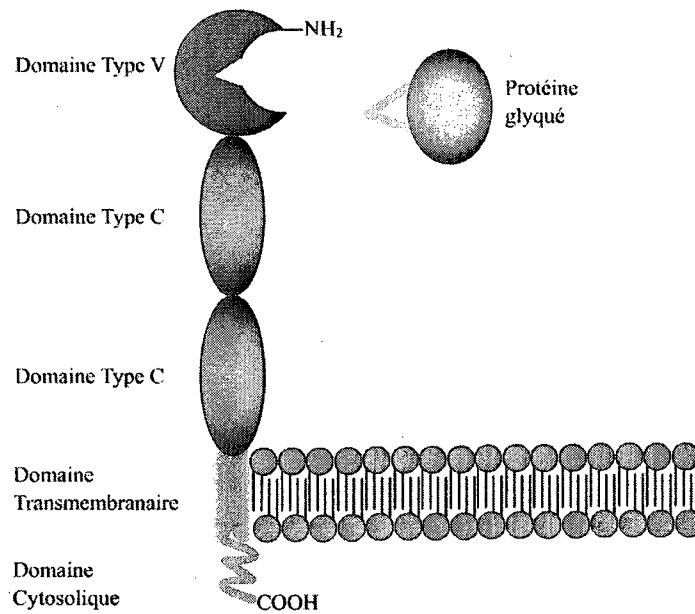


Figure 4 : Schéma de la structure du récepteur RAGE

Le récepteur RAGE de la famille des récepteurs de type immunoglobuline. Le récepteur RAGE compte 5 domaines : le domaine variable deux domaines constants un domaine transmembranaire et un domaine cytoplasmique.

Tableau 4 : Liste des différents ligands pouvant se lier au récepteur RAGE

(DATTILO *et al.*, 2007)

Ligands	kD
AGE-BSA	60 nM
HMG1	6,4 nM
Peptide β -amyloïde	56,8 nM
S100A12	91 nM
S100B	11 μ M

1.3.2.4- La signalisation de RAGE

La cascade de signalisation majeure déclenchée par la liaison AGE-RAGE semble être l'induction du stress oxydatif (BASTA *et al.*, 2004). En effet, la transduction du signal active la NAD(P)H-oxydase qui augmente la production d'espèces oxygénées réactives (ROS). L'augmentation des ROS favorise l'activation de NF- κ B qui est sensible à l'oxydoréduction (SIEBENLIST *et al.*, 1994) et active la transcription de multiples gènes proinflammatoires tel le TNF α , IL-1, IL-6 l'interféron- γ et différentes molécules d'adhésion cellulaires (BASTA *et al.*, 2002; SCHMIDT *et al.*, 1995). Plusieurs autres protéines de signalisation sont impliquées dans la signalisation suite à la liaison AGE-RAGE comme : les MAP kinases, cdc24/rac, p21ras, PI3 kinase et Jak/STAT (BIERHAUS *et al.*, 1997; HUTTUNEN *et al.*, 1999; JINN *et al.*, 2001; LANDER *et al.*, 1997; SCHMIDT *et al.*, 1995; SIMM *et al.*, 1997; WAUTIER *et al.*, 2001). De plus, l'activation de ces voies de signalisations semble interférer (cross talk) avec d'autre voie de signalisation comme la voie de l'angiotensine (FUKAMI *et al.*, 2008).

1.3.2.5- Les effets réceptoriels des cellules vasculaires

Les effets réceptoriels varient beaucoup en fonction du type cellulaire. Le récepteur RAGE est exprimé dans plusieurs types cellulaires dont les tissus vasculaires. Il est présent entre autre sur les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses et les macrophages. L'activation par RAGE mène à plusieurs dysfonctions cellulaires énumérées dans le Tableau et la Figure 5. Par exemple, la liaison de AGEs aux cellules endothéliale augmente leur perméabilité aux macromolécules (KUO *et al.*, 2007).

Tableau 1 : Dysfonctions des cellules vasculaires causé par la liaison AGE-RAGE

(Inspiré de Basta *et al.* 2004)

Type cellulaire	Dysfonctions ↑↓	Références
Cellules endothéliales	↑ perméabilité de la couche endothéliale ↑ du stress oxydatif intracellulaire ↑ de l'expression des molécules d'adhésion ↑ de l'activité procoagulante ↑ de l'endothéline-1 et ↑ vasoconstriction	Esposito 1989, Wautier 1996 Yan 1994, Wautier 2001, Bierhaus 1997 Schmidt 1995, Basta 2002 Esposito 1989, Bierhaus 1997 Quehenberger 2000
Monocytes	↑ PDGF, IGF-1, IL-1 TNF-α, ↑ Chemotaxisme	Vlassara 1988, Kirstein 1990, Kirstein 1992 Kirstein 1990, Miyata 1994
Cellules musculaires lisses	↑ de la prolifération	Sakaguchi 2003, Sakata 2000, Zhou 2003

1.3.2.6- RAGE et autres maladies

Plusieurs études montrent l'effet de stimulation du récepteur RAGE comme étant une cause directement lié à divers complications du système vasculaire comme des cas de rétinopathies, néphropathies et d'athéroscléroses. De plus, l'activité du récepteur RAGE est suspectée dans une multitude de maladies comme certaines formes de cancer, la maladie de parkinson, l'arthrite rhumatoïde, la maladie d'Alzheimer et bien d'autres.

1.4- Traitements pharmacologiques contre les AGEs.

Il y a différentes stratégies qui sont en cours de développement afin de contrer l'effet des AGEs. Ces stratégies peuvent être divisées en deux grandes cibles soit cibler les AGEs directement ou cibler le récepteur RAGE.

1.4.1- La Cible AGEs

Il y a différentes structures de AGEs présentes dans l'organisme ce qui rend le développement d'un agent pharmacologique ciblant chacun d'entre eux impossible. Il existe toutefois des agents pharmacologiques qui brisent la réticulation causée par les AGEs. Le Bromure de N-phenacylthiazolium (PTB) semble en effet cliver certaine réticulation possédant un double carbonyle (VASAN *et al.*, 1996). Mais ce produit s'est avéré peu stable en solution aqueuse et de surcroît *in vivo* (THORNALLEY *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003).

Des dérivés plus stables du PTB ont été développés comme le C16 (Gang CHENG *et al.*, 2005) et le ALT-711 développé par la compagnie Alteon qui est présentement en étude clinique avec des résultats prometteurs (KASS *et al.*, 2001; VASAN *et al.*, 2003).

Étant donné l'hétérogénéité des AGEs, une alternative aux briseurs de réticulation est l'inhibition de leur formation. L'un des premiers agents inhibiteurs développés est l'aminoguanidine (THORNALLEY *et al.*, 2000). Son mode d'action n'est pas encore bien caractérisé, mais il pourrait réagir avec les produit d'Amadori afin d'empêcher la formation des AGEs et pourrait aussi agir comme chélateur de métaux réduisant de beaucoup la vitesse de dégradation des produits d'Amadori en glyoxale et méthylglyoxale qui peuvent à leur tour former des AGEs (Figure 2). L'aminoguanidine est présentement en essai clinique de phase III. Il existe une multitude d'autres agents qui protègent potentiellement contre les AGEs tel qu'énumérés dans le tableau 6 (HARDING *et al.*, 2006) ainsi qu'une panoplie d'agents naturels comme le cumin et le thé vert. Beaucoup de ces agents semblent principalement réduire le niveau de stress oxydatif.

1.4.2- La Cible RAGE

En second lieu, il est possible de bloquer l'activation du récepteur RAGE par des antagonistes. Il y a l'héparine de bas poids moléculaire (LMWH) (MYINT *et al.*, 2006) qui semble bloquer le récepteur RAGE ainsi que deux molécules de la compagnie Pfizer soit le TTP488 et le TTP4000 qui sont en essai clinique avec des résultats très attendus (YAMAMOTO *et al.*, 2007).

Tableau 6 : Différents agents pharmacologiques qui préviennent la formation de AGEs

(HARDING *et al.*, 2006)

Agents qui protège contre la glycation

Aspirin (acetylsalicylic acid)
Ibuprofen
Diclofenac
Amino acids
Polyamines
Carnosine
Glutathione (gamma-glutamyl-cysteinyl-glycine)
Aminoguanidine
Metformin and buformin (biguanides)
Penicillamine
Pyridoxamine
Aminoguanidine-pyridoxal adduct
Pioglitazone
Pentoxifylline
Thiamine pyrophosphate
OPB-9195 ((+/-)-2-isopropylidinehydrazono-4-oxo-thiazolidin-5-ylacetanilide)
ALT-946 (N-(2-acetamidoethyl)hydrazinecarboximidamide hydrochloride),
Lipoic acid
Olmesartan and other angiotensin II type I receptor antagonists
Captopril and other ACE inhibitors
Pyruvate
Dilazep
Anserine
Cysteine,
Cysteamine
Sulphite
3-mercaptopropionate

2.- Problématiques et objectifs

Les AGEs sont l'une des causes des complications cardiovasculaires associées au diabète. Leur accumulation affecte directement divers éléments qui composent les vaisseaux sanguins ce qui cause des effets notables sur la compliance, la rigidité vasculaire et la dysfonction endothéliale. (ARONSON *et al.*, 2002; BASTA *et al.*, 2004; GOLDIN *et al.*, 2006; ZIEMAN *et al.*, 2004) Notre laboratoire s'intéresse particulièrement à la biophysique associée aux changements structuraux ou morphologiques de composantes biologique. L'objectif général de ce mémoire est d'étudier et observer les perturbations et altérations causées par les AGEs sur la mécanique moléculaire et la physiologie de différents éléments d'un vaisseau sanguin comme les fibres de collagène et les cellules endothéliales.

2.1- Objectif Spécifique 1

Diverses études démontrent que les protéines de structure comme le collagène subissent de la réticulation par les AGEs (DYER *et al.*, 1992). Ces modifications peuvent changer la structures ainsi que les propriétés physiques et mécaniques du collagène (REDDY *et al.*, 2002; REDDY, 2004a; REDDY, 2004b; ZIEMAN *et al.*, 2004). Afin de mieux comprendre les effets biophysiques de la réticulation du collagène, nous avons étudié ces changements structuraux et mécaniques à l'aide d'outil comme le microscope à force atomique et la dynamométrie. Ceci nous permettra d'associer différents déterminants moléculaires et macroscopiques des tissus à base de collagène aux différentes propriétés

mécaniques de ces derniers. Ensuite, l'explication des phénomènes de réticulation permettra une meilleure compréhension des causes des différentes complications diabétiques et ouvrira la porte à de nouvelles voies thérapeutiques.

2.2- Objectif Spécifique 2

L'endothélium est le lieu d'échange entre le sang et les tissus périphériques. Les cellules qui la composent sont directement exposées au glucose sanguin ce qui les prédispose à subir des la réticulation pouvant affecter leur structure. De plus, la présence de AGEs dans le sang affecte grandement le bon fonctionnement des cellules endothéliales (BIERHAUS *et al.*, 2005; KUO *et al.*, 2007; URIBARRI *et al.*, 2007). Nous avons donc étudié l'effet de la réticulation par les AGEs sur la mécanique membranaire des cellules endothéliale suite à l'exposition chronique à des concentrations élevées de glucose par spectroscopie de force et l'effet de la stimulation du récepteur RAGE par microscopie optique. Nous caractériserons certains aspects mécaniques souvent négligés dans la rigidité vasculaire et qui peuvent être des facteurs importants dans le développement de complications associées au diabète. Ceci permettra de mieux comprendre l'effet à long terme d'une glycémie élevée sur le tissu endothéliale particulièrement dans les cas de diabète.

3.- Les modèles expérimentaux

Plusieurs complications associées au diabète affectent le système vasculaire (Figure 6). Les AGEs sont dans la plupart des cas les instigateurs des dysfonctionnements. Nous avons centré notre étude sur deux éléments importants du système soit la tunique externe des larges vaisseaux avec le collagène de type I comme modèle expérimental et l'endothélium omniprésent dans tout le système vasculaire dans un modèle de cellules endothéliales en culture.

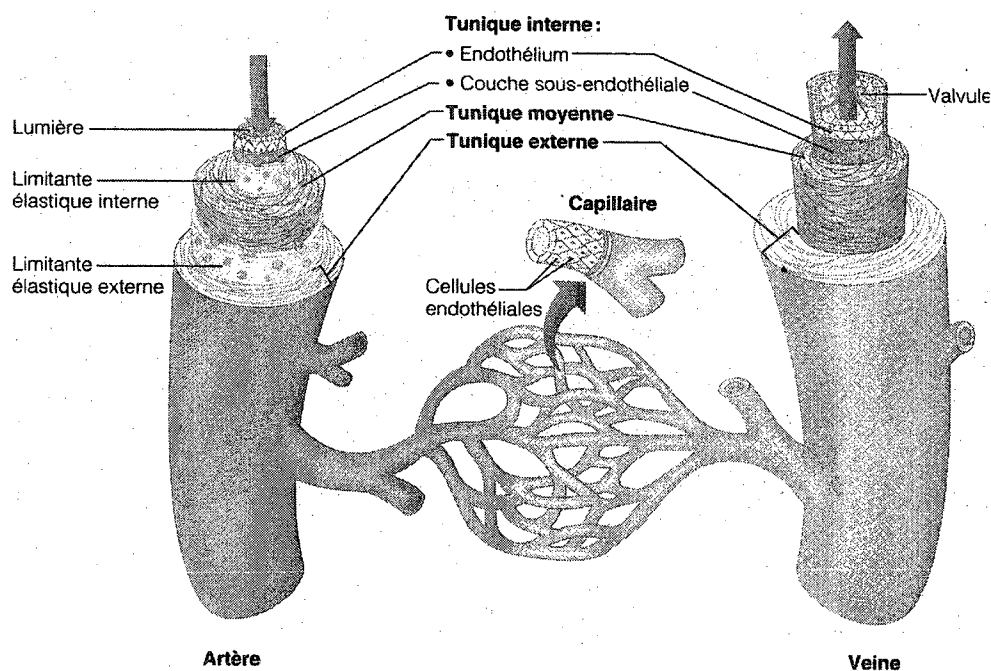


Figure 6 : Schéma du système vasculaire

Le système vasculaire est divisé en trois grandes catégories : les artères, les veines et les capillaires. Les artères et les veines sont composées de la tunique interne qui comprend l'endothélium, de la tunique moyenne composée de cellules musculaires lisses et de la tunique externe qui contient beaucoup de collagène (MARIEB 1998).

3.1- Le collagène de type I

Les tissus utilisés comme modèles sont des fibres de collagène issues de tendons extraient de queues de rats. Ceux-ci sont majoritairement composés de collagène de type I. Le collagène est une protéine de structure importante dans plusieurs tissus dont les vaisseaux sanguins. Il existe environ 26 (YURCHENCO, 1994) types de collagène différents qui ont des propriétés, des structures et des expressions différentielles selon les tissus où ils sont exprimés. Dans cette famille, le collagène type I est largement le plus présent puisqu'il s'agit de la protéine la plus exprimée et primordiale au maintien et au support des organismes vertébrés (VIGUET-CARRIN *et al.*, 2006). Il compose la matrice de la peau, des os et des muscles dont les extensions sont les tendons et ligaments. On le retrouve dans les tissus conjonctifs de tous les organes. Dans les vaisseaux sanguins, il compose la tunique externe et est associé à la rigidité alors que l'élastine est associée à l'élasticité. Il est synthétisé par les fibroblastes à partir de trois chaînes polypeptidiques ($2\alpha 1$ et $1\alpha 2$) composé d'une succession de Gly-X-Y dans leur structure primaire où X et Y sont souvent des prolines et des hydroxyprolines ce qui donne à la structure tertiaire du collagène une caractéristique relativement unique de triple hélice gauche appelée monomère (Figure 7). Les interactions qui maintiennent cette structure sont principalement des liaisons hydrogènes provenant du squelette polypeptidique des différentes chaînes (Figure 7). Des défauts génétiques dans la structure primaire d'une des chaînes forment des triples hélices beaucoup moins stables et un collagène beaucoup plus fragile comme dans la maladie Osteogenesis Imperfecta (CARLETON *et al.*, 2008). Les monomères sont sécrétés sous forme de procollagène protégés par des peptides globulaires en N et C terminal puis, après clivage enzymatique, forment spontanément

des fibrilles de leur extrémité N-terminal au C-terminal. La structure des fibrilles est stabilisée grâce à une réticulation endogène des monomères catalysée par la lysyl oxydase (BAILEY, 2001). Les fibrilles sont les unités fonctionnelles du collagène de type I et présentent une structure striée avec une périodicité caractéristique de 67 nm (GRAHAM *et al.*, 2004; YURCHENCO, 1994). Elles ont un diamètre qui varie de 50 à 500 nm (FREED *et al.*, 2005). Les fibrilles s'assemblent en fibres (fascicules) plus ou moins denses selon les tissus. Les interactions qui maintiennent les fibrilles ensemble ne sont toujours pas bien définies (PROVENZANO *et al.*, 2006). De petits protéoglycans riches en leucine permettent une meilleure orientation des fibrilles, mais ne sont pas attachés de façon covalente à celles-ci. La structure des fibrilles permet un maintien de la structure sans liaison covalente. Le collagène est également une protéine à longue durée de vie. En effet, la demi-vie du collagène est souvent évaluée à plusieurs dizaines d'années selon les tissus (VERZIIL *et al.*, 2000) ce qui fait de cette protéine une cible pour des modifications chimiques à long terme. L'étude de la glycation sur un tissu modèle composé uniquement de collagène de type I représente une avenue intéressante pour comprendre les effets des AGEs sur chacun des éléments qui composent les vaisseaux sanguins.

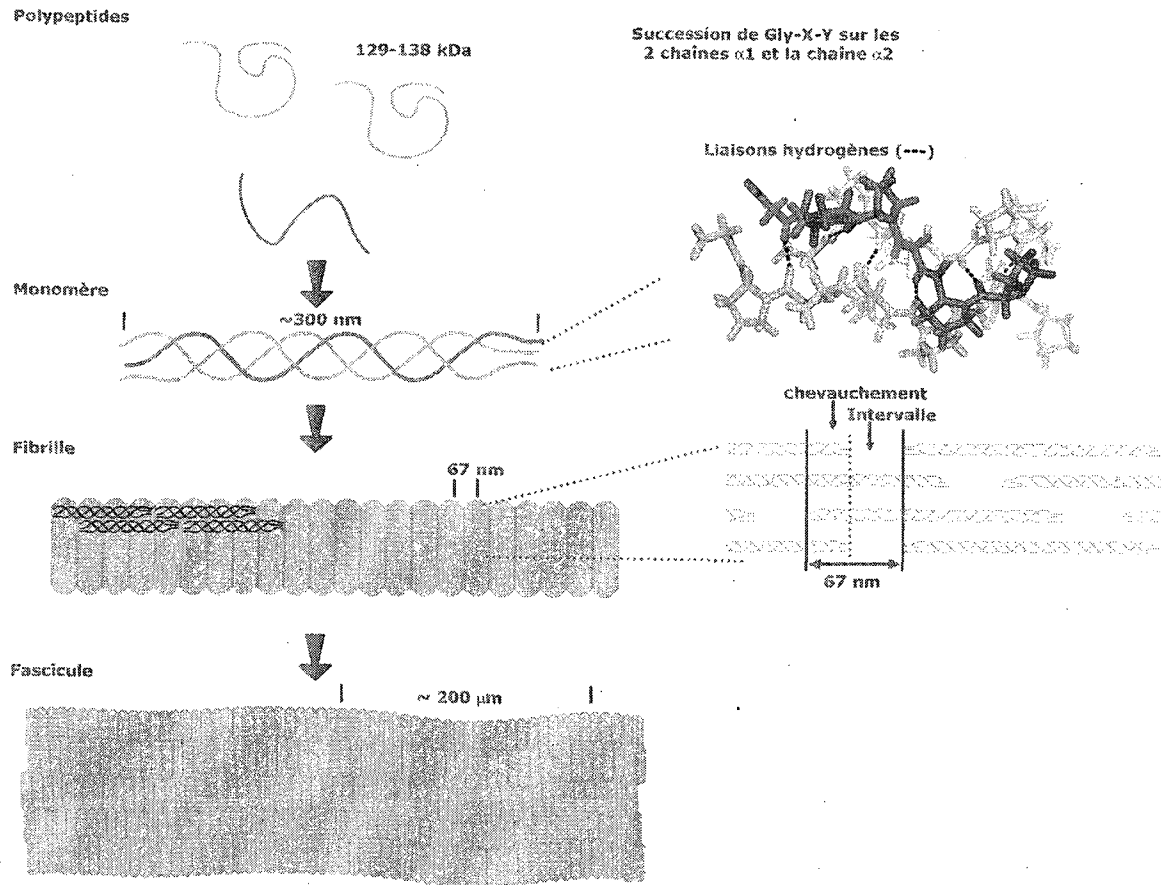


Figure 7 : L'assemblage du collagène

Les monomères de collagène sont formés de trois chaînes polypeptidiques. Les monomères s'assemblent spontanément en fibrilles lorsqu'ils sont en solution. Les fibrilles ont un diamètre qui varie de 50 à 500 nm (FREED *et al.*, 2005). Sur chacune des fibrilles on peut observer un patron répétitif d'une longueur caractéristique de 67 nm représenté par une succession de chevauchements et d'intervalles. Les fibrilles s'assemblent en une structure plus grande appelée fascicule qui compose la majorité des tendons et ligaments.

3.2- Les cellules endothéliales

Le second élément étudié est l'effet des AGEs sur les cellules endothéliales. Celles-ci composent l'endothélium vasculaire qui tapisse la totalité du système vasculaire (Figure 6). La fonction de l'endothélium est principalement de contenir le sang et permettre les échanges avec les tissus. L'endothélium participe également à la circulation sanguine en inhibant la coagulation et par sa réponse à diverses hormones. L'endothélium module d'ailleurs la contraction et la relaxation des cellules musculaires lisses en sécrétant de l'endothéline-1 et du monoxyde d'azote. Les cellules endothéliales sont polarisées et maintenues ensemble par des desmosomes puis attachées à une lame basale composée principalement de collagène de type IV par des hémidesmosomes. Elles prennent différentes formes selon le type de vaisseau sanguin où elles se trouvent comme dans les artères où elles prennent une forme alvéolaire ou bien les capillaires où elles forment un tube dont la circonférence est composée d'une seule cellule (Figure 8). En faisant directement face à la lumière des vaisseaux, les cellules endothéliales sont inévitablement exposées au glucose sanguin. Afin d'étudier l'effet des AGEs sur l'endothélium composant les vaisseaux sanguins, nous avons utilisé les cellules endothéliales en culture comme modèle expérimental.

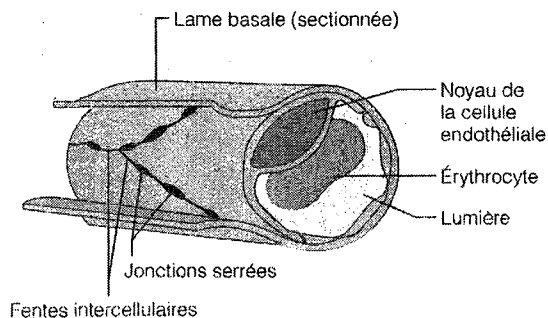


Figure 8 : Schéma d'un capillaire.

Les capillaires sont formés d'une mono couche endothéliale dont une cellule peut faire la circonférence complète d'un capillaire (MARIEB 1998).

4- Matériel et méthodes

4.1- L'imagerie par microscopie à force atomique

L'expertise en microscopie à force atome du laboratoire s'est avérée un atout majeur pour caractériser les propriétés moléculaires du collagène.

4.1.1- L'Histoire de l'AFM

En 1981, Gerd Binnig et Heinrich Rohrer, deux physiciens travaillant pour IBM, ont développés le microscope à effet tunnel pouvant déterminer la topographie d'un matériel à l'échelle atomique. Les physiciens ont d'ailleurs reçu le Prix Nobel de Physique en 1986 pour l'invention de ce microscope. Mais l'utilisation de la STM n'est uniquement possible que sur des surfaces conductrices ou semi-conductrices. En 1986, Gerd Binnig, Calvin Quate et Christoph Gerber ont donc développé la microscopie à force atomique permettant de faire la topographie de matériaux même lorsqu'ils sont isolants (BINNIG 1986).

4.1.2- Principes et fonctionnement de l'AFM

La microscopie à force atomique est une technique de microscopie à balayage à l'aide d'une sonde (SPM). (FOTIADIS *et al.*, 2002) En effet, plutôt que d'observer directement l'échantillon, c'est une pointe agissant comme sonde qui entre en contact avec ce dernier afin de détecter les différentes structures présentes sur sa surface et former une image topographique (Figure 9). La pointe est généralement montée à

l'extrémité d'une structure porte-à-faux flexible (cantilever) agissant comme un ressort lors du contact avec l'échantillon.

L'interaction entre la pointe et l'échantillon résulte en une déformation du cantilever selon la loi de Hooke :

$$F = -k x$$

Équation 1

Où F est la force appliqué sur ou par l'échantillon, k la constante de ressort du cantilever et x la déflexion du cantilever. Les différentes forces en jeux à cette échelle sont principalement la capillarité qui se forme entre la pointe et l'échantillon, les répulsions électrostatique et les forces de Van der Waals. Les différentes hauteurs des structures de l'échantillon changent la position de la pointe par rapport à la surface ce qui se traduit par des déflexions du cantilever. Afin de mesurer les déflexions, un laser est placé au dessus du cantilever qui est recouvert d'un matériel réfléchissant, généralement l'or. Les déflexions sont donc associés aux changements de l'angle de réflexion du laser. Celui-ci est détecté par un photodétecteur, une photodiode segmentée en cadrans, qui transforme la position de la réflexion du laser sur un cadran en une information électrique convertie en données de la hauteur des structures. Le balayage de la pointe qui est un mouvement de va-et-vient et ligne par ligne est assuré par un cristal piézoélectrique qui a la propriété de se dilater ou se contracter en fonction de la direction et du potentiel du champ électrique qu'on lui applique. Le cristal piézoélectrique peut aussi se déplacer sur l'axe vertical afin de maintenir la force appliquée sur l'échantillon constante par une boucle de rétrocontrôle. Chacune des lignes balayées comportent les données de la modulation de la hauteur du piézo et de la déflexion enregistrées par la photodiode et sont recomposés

en une image matricielle sur un ordinateur. Il existe différents modes d'imageries selon si la pointe est en contact avec l'échantillon (Mode Contacte) ou si on induit une vibration de la pointe pour en effleuré la surface (Mode Tapping).

4.1.2.1- Mode contacte

Le mode contacte est un balayage avec une force constante appliqué par la pointe sur l'échantillon. C'est un mode qui présente une très grande résolution spatiale. Par contre, puisque la pointe est continuellement en contact avec l'échantillon, la friction est omniprésente ce qui peut modifier l'échantillon pouvant même arracher des molécules de la surface.

4.1.2.2- Mode tapping

Pour le mode tapping, il faut induire une vibration à haute fréquence du cantilever afin de le faire osciller à une amplitude donnée et c'est cette amplitude qui est maintenu constante lors du balayage. Les différentes forces ont donc comme effet d'atténuer ou d'amplifier l'amplitude de l'oscillation du cantilever. Le contacte avec l'échantillon est intermittent réduisant grandement la friction ce qui fait de ce mode AFM un outil parfait pour les échantillons plus souples et délicats.

4.1.3- Avantages et inconvénients

Puisque l'AFM est la dernière génération d'instrument d'imagerie à haute résolution, il est très souvent comparé au microscope électronique. L'AFM présente plusieurs avantages sur le microscope électronique.

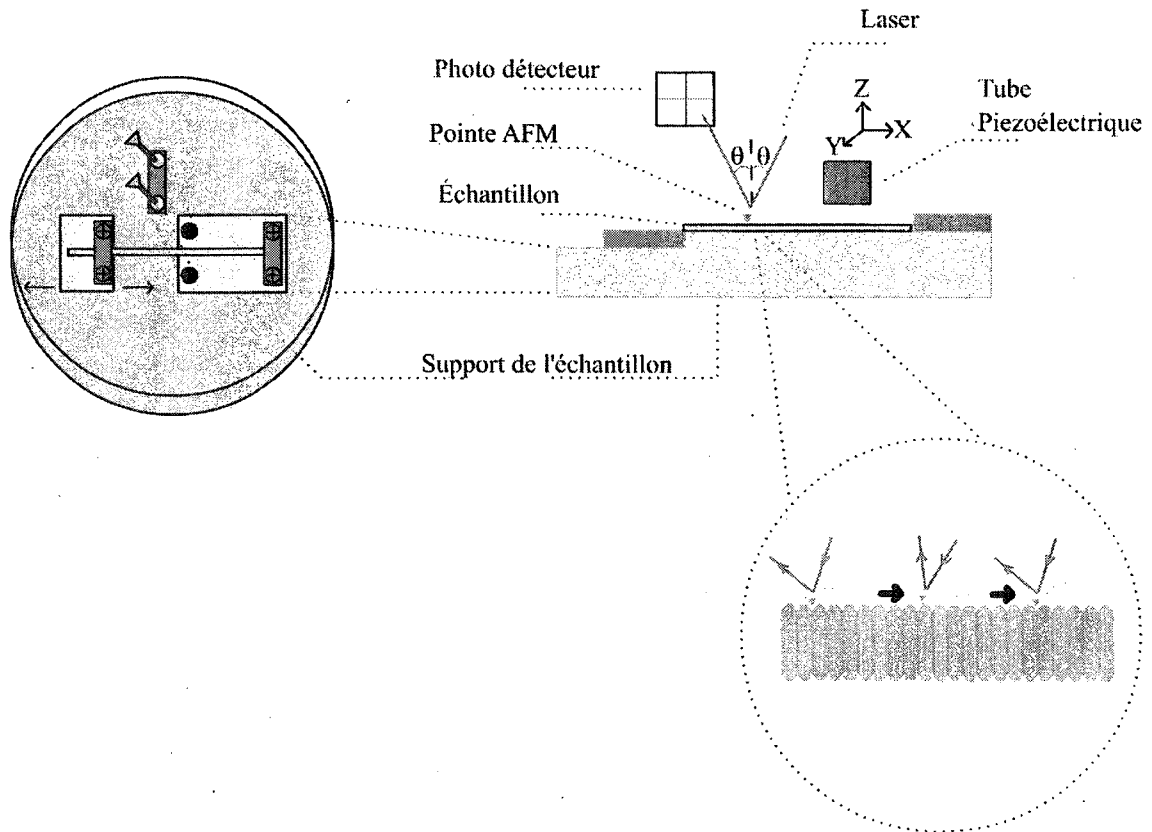


Figure 9 : Schéma d'un balayage AFM sur un tissu de collagène

Grâce à un dynamomètre, nous pouvons fixer un tissu de collagène sous une elongation et un stress désiré. Nous pouvons ensuite procéder à l'imagerie AFM en balayant la surface du tissu fixé sur le support de l'échantillon à l'aide d'une pointe nanoscopique. La hauteur des différentes structures de la surface balayée est détectée par la déflexion de la pointe montée sur un cantilever. La déflexion de la pointe est mesurée par la réflexion sur un photodétecteur d'un laser pointé à sa surface. Le mouvement de balayage de la pointe est donné par un tube piézoélectrique.

Tout d'abord, il permet d'obtenir une vraie image tridimensionnelle puisque la hauteur est directement mesurée. L'échantillon ne requière aucune préparation par l'ajout d'agent de marquage ou de contraste. Les images ne se font pas nécessairement dans le vide, mais se font également dans les conditions ambiantes et même dans un milieu aqueux ce qui est idéal pour l'imagerie de molécules biologiques. Les inconvénients de l'AFM sont tout d'abord la limite de la surface que l'on peut imager ainsi que la hauteur. En effet, la zone d'imagerie est délimitée par le cristal piézoélectrique à environ 150 μm x 150 μm et quelques micromètres en hauteur limitant aussi la possibilité d'imagerie à la surface sans bien résoudre les structures flottantes. Dans ce contexte, le microscope électronique peut obtenir des images sur des dimensions de l'ordre du millimètre. Le temps d'acquisition est aussi généralement beaucoup plus long que pour un microscope électronique, mais le développement de l'AFM tel la vidéoAFM permet de plus en plus de réduire le temps d'acquisition.

4.2- La spectroscopie de force

L'expertise en AFM du laboratoire nous a permis de concevoir un appareil permettant la mesure de forces au niveau cellulaire (spectroscopie de force) par l'utilisation du ressort nanoscopique qu'est un cantilever AFM (LAMONTAGNE *et al.*, 2008; ZLATANOVA *et al.*, 2000). En déterminant précisément la constante de ressort du cantilever par la méthode d'analyse de l'amplitude du bruit thermique (BUTT *et al.*, 1995; HUTTER *et al.*, 1993), celle-ci permet la conversion de la mesure électrique de la déflexion du cantilever en une force en Newton (Figure 10a). Le système nous permet des mesures dans une gamme force unimoléculaire (GRANDBOIS *et al.*, 1999; ZLATANOVA *et al.*,

2000). L'appareil est aussi adapté aux applications cellulaires (LAMONTAGNE *et al.*, 2008). Son installation sur un microscope inversé permettant le positionnement de la pointe AFM au dessus des échantillons de la dimension d'une cellule (Figure 10a). Un cristal piézoélectrique vertical permet de contrôler précisément la distance entre la pointe et l'échantillon. Une expérience cellulaire typique implique le contact de la pointe avec la surface apicale d'une seule cellule (Figure 10b). Les courbes d'approche et de rétraction sont enregistrées suite au contact avec les cellules. Les courbes d'approche permettent de caractériser la rigidité des surfaces et celles de rétraction permettent de mesurer les interactions entre la pointe et les cellules ou toutes autres surfaces sondées. Il est également possible de fonctionnaliser la pointe avec une molécule comme un ligand pour en déterminer la force d'interaction avec les échantillons sondés (GRANDBOIS *et al.*, 1999; GRANDBOIS *et al.*, 2000; MITCHELL *et al.*, 2007). Nous avons principalement évalué la rigidité des cellules sur les courbes d'approche selon le modèle de Hertz (OBERLEITHNER *et al.*, 2006; RADMACHER *et al.*, 1996).

$$E = \frac{F\pi \cdot (1 - \nu^2)}{2\delta^2 \tan \alpha} \quad \text{Équation 2}$$

Où E est le module de Young, F la force mesurée par l'appareil, ν le ratio de Poisson estimé à 0,5 puisque les cellules ne sont pas compressibles donc ne change pas de volume lorsqu'on les déforme (ratio de Poisson appliqué à des matériaux comme le caoutchouc), α l'angle de la pointe AFM qui est de 35° et δ la distance après le point de contact avec la cellule où on prend la mesure de force qui est de 300 nm dans notre cas. La rigidité des cellules est donc évaluée selon leur module de Young en Pascal.

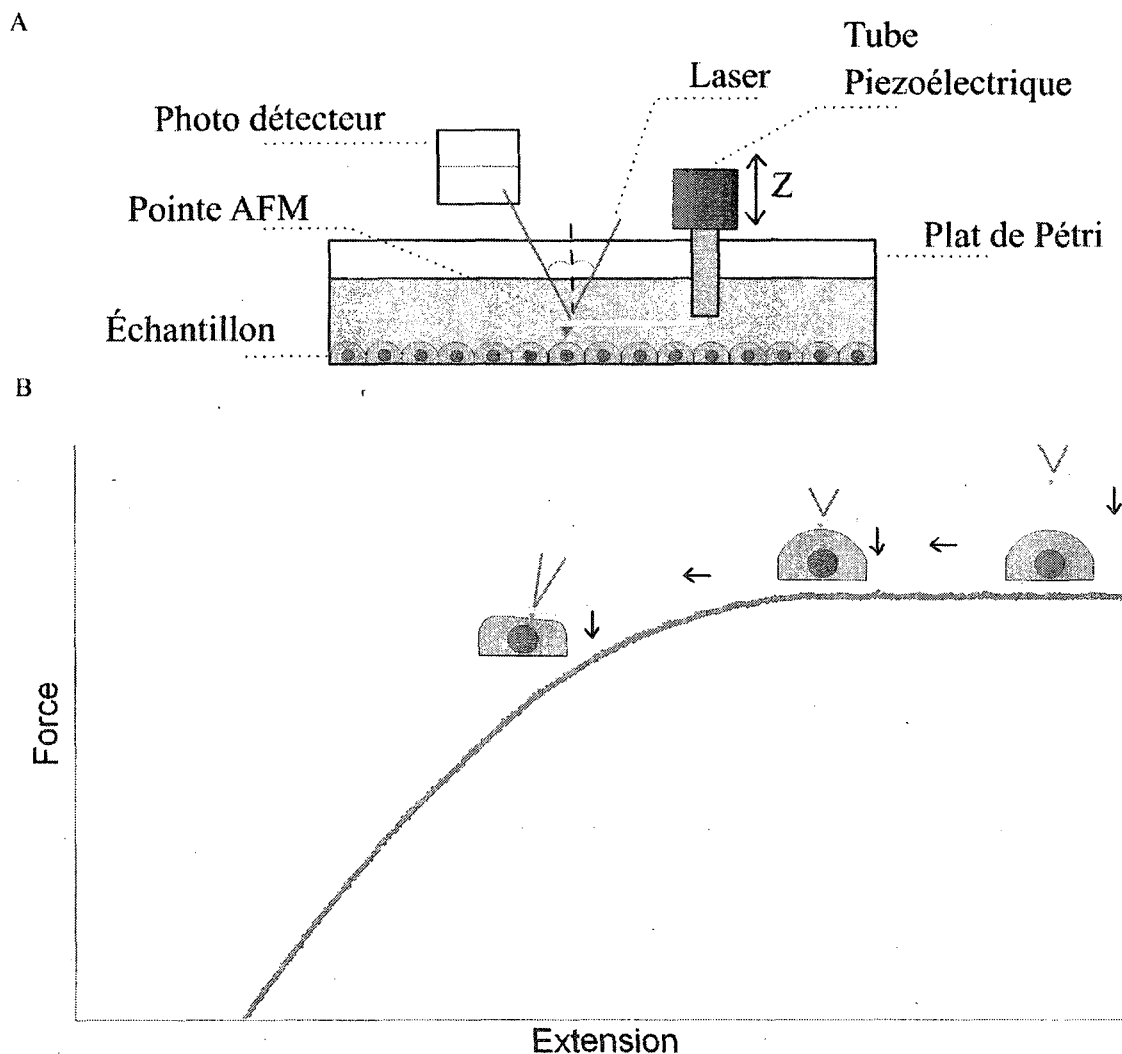


Figure 10 : Schéma d'une expérience de spectroscopie de forces sur cellule

A) La spectroscopie de force utilise la pointe et AFM est utilisée comme microsonde pour toucher les cellules. La déflexion du cantilever est détectée par un laser, mais cette fois-ci la déflexion du laser est convertie en force à partir de la constante de ressort. L'approche délicate des cellules se fait avec un tube piézoélectrique. B) Courbe d'approche typique sur des cellules. On mesure une déflexion de la pointe lorsque celle-ci entre en contact avec la cellule. Plus on descend la pointe plus on applique de force sur la cellule et celles-ci se déforme sous la pression appliquée.

4.3- Extraction des tendons

Les rats utilisés dans cette étude sont de race Sprague-Dawley (Charles-River) mâles adultes âgés de 93 jours et ayant un poids d'environ 350-400g. Les rats sont traités selon un protocole approuvé par le comité éthique de protection animal de la FMSS. La glycémie est mesurée par une fine coupure à l'extrémité de la queue à l'aide d'un glucomètre AccuCheck (Roche). Aucun des rats utilisés dans l'étude n'avait une glycémie supérieure à 10 mM. Suite à l'anesthésie, la queue des rats est prélevée à la base par scission. La peau de la queue est ensuite délicatement coupée de façon longitudinale et ensuite retirée. Une pince hémostatique est ensuite appliquée sur les vertèbres de la queue une à une afin de les disloquer par un mouvement délicat de gauche à droite. Les vertèbres disloquées peuvent se retirer avec une série de tendons attachés à celles-ci. Les tendons sont ensuite détachés de la vertèbre et immergés dans une solution tampon (PBS pH 7.4) et congelés à -80°C pour être utilisés plus tard. Nous avons également précédé à l'extraction de tendon de queue de souris NOD femelles obtenues du laboratoire du Dr Abdelaziz Amrani (BESIN *et al.*, 2008). Ces souris développent un diabète de type 1 à environ 16 semaines. Le diagnostic du diabète est confirmé par deux tests aux bandelettes réactives Uristix (Bayer) supérieur à 14 mM dans leur urine.

4.4- Expérience d'étirement

Nous avons conçu à partir d'un appareil industriel (Dillon Quantrol) un dynamomètre nous permettant l'étirement de matériel biologique immergé dans une solution aqueuse et en mesurer les forces tel qu'illustré à la Figure 11a. Le tendon est monté sur les supports

et ancré par des vis afin qu'il ne glisse pas. Un système de pied à coulisse permet le mouvement d'un des supports alors que l'autre reste fixe. Lorsque le tendon est sous tension la force appliquée à l'échantillon est mesurée par un détecteur qui retransmet les valeurs à un ordinateur. Les données sont ensuite traitées par l'ordinateur en un graphique de force mesurée par le détecteur en fonction du déplacement du pied à coulisse. Afin de normaliser les valeurs, la distance zéro est enregistrée à chaque étirement et le diamètre des tendons est évalué par microscopie avant chaque expérience. Le diamètre permet la normalisation des forces appliquées par l'aire axiale du tendon.

$$P = F / A \quad \text{Équation 3}$$

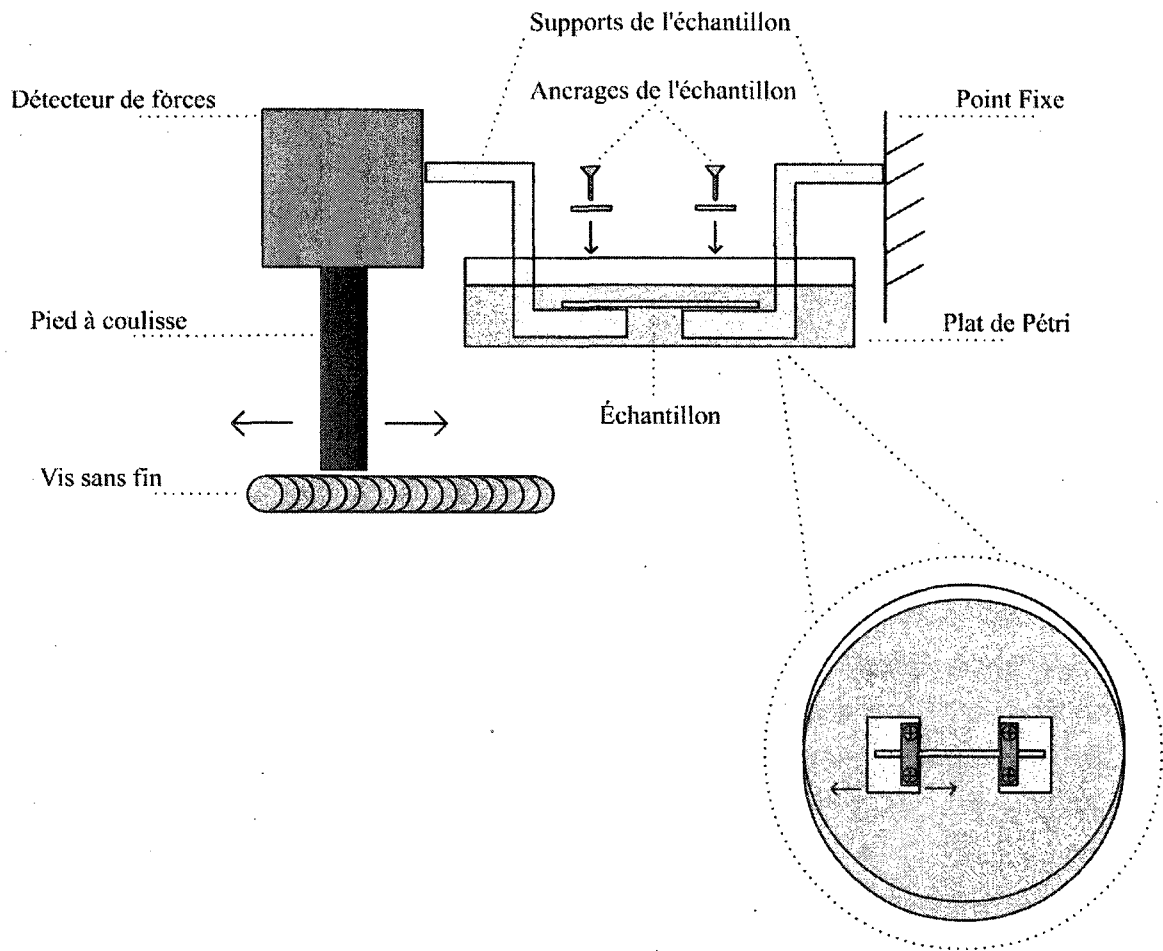
Où P est la pression en Pascal, F la force en Newton et A l'aire en mètre carré.

La distance zéro permet la normalisation de la longueur afin de déterminer l'élongation relative.

$$\Delta L = L - L_0 \quad \Delta L / L_0 \times 100 \% = \text{Élongation relative} \quad \text{Équation 4}$$

Où ΔL est l'élongation, L est la position du pied à coulisse et L_0 est la longueur du tendon. Les données après normalisation permettent d'analyser différents paramètres mécaniques d'élasticité du tendon. Les principaux paramètres étudiés sont le module de Young, le point de rupture, la vitesse de relaxation et l'énergie de déformation. L'analyse des courbes d'étirement se fait à l'aide du logiciel Igor Pro.

A



B

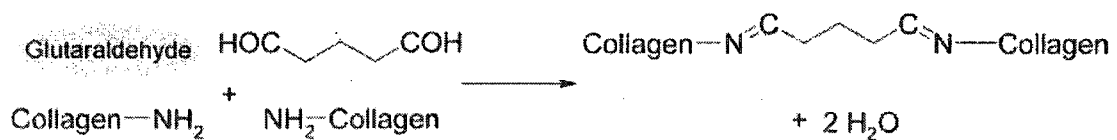


Figure 11 : Schéma du dynamomètre

A) Le dynamomètre permet de mesurer en continue la force appliquée sur l'échantillon par l'élongation de ce dernier. L'échantillon est ancré aux supports. L'un des supports de l'échantillon est attaché à un pied à coulisse qui permet les déplacements pour appliquer un stress. Les supports de l'échantillon baignent dans une solution tampon ce qui permet de faire les mesures en milieu physiologique. B) La réaction de réticulation à l'aide du glutaraldéhyde sur le collagène se produit entre les amines primaires de la protéine et affecte la structure du tissu (ENGLERT *et al.*, 2007).

4.5- Traitement des tendons au glutaraldéhyde

Les tendons sont montés sur le dynamomètre puis on procède à une expérience d'étirement normale pour enregistrer les courbes de base afin de déterminer les paramètres mécaniques natifs. Ensuite, la solution (PBS pH 7,4) est remplacée par une solution contenant 4 % de glutaraldéhyde puis incubé pendant 10 minutes à la température de la pièce. Le glutaraldéhyde est un agent de fixation rapide qui permet d'introduire des réticulations dans la structure du collagène. La réaction entre le glutaraldéhyde et les protéines se produit de façon similaire à la réaction de glycation entre les amines primaires des chaînes latérales et les carbonyles de la molécule (Figure 11b). Suite à l'incubation, de nouvelles courbes d'étirements sont enregistrées puis analysées

4.6- Traitement des tendons au glucose et traitement PTB

Les tendons sont montés sur le dynamomètre puis on procède à une expérience d'étirement normale pour enregistrer les valeurs natives. Ensuite, les tendons sont incubés dans une solution de 0,5 M de glucose ou de tampon seul (PBS pH 7,4) et 100 μ M de sulfate de cuivre qui agit de catalyseur de la réaction de glycation (SAJITHLAL *et al.*, 1999) pendant une semaine à 37°C. Suite à l'incubation, de nouvelles courbes d'étirements sont enregistrées puis analysées. Les tendons sont ensuite incubés cette fois-ci avec 10 mM de PTB (VASAN *et al.*, 1996) de 12 à 48h, puis une dernière série de courbes sont enregistrées.

4.7- Caractérisation de la glycation du collagène par immunofluorescence

Les tendons sont traités à 0,5 M de glucose comme précisé à l'étape précédente et ensuite rincés avec la solution tampon (PBS 3 fois). Les tendons sont soumis à un anticorps primaire de souris anti-AGE (CosmoBio) à 1 µg /mL pendant 2h à la température de la pièce suivit d'un rinçage. Finalement, les tendons sont incubés avec un anticorps secondaires de chèvre anti-IgG de souris couplé à un fluorophore, l'Alexafluor 488 (Molecular Probe), d'une dilution 1/200, puis rincés. Les tendons sont ensuite déposés sur une lame de microscope puis recouvert de Vectashield (Vector Laboratories), un agent qui réduit le photoblanchiment et permet de conserver le échantillon plus longtemps. L'échantillon est scellé par une lamelle et du vernis. L'observation de l'échantillon se fait sur un microscope à épifluorescence (Zeiss Axiovert 200M) avec un filtre d'excitation de 495 nm et un filtre d'émission de 519 nm.

4.8- Préparation des échantillons pour l'imagerie par AFM

Les tendons sont tout d'abord nettoyés dans une solution de 0,1 % de Triton X-100 sur un agitateur de type vortex pendant 2 h puis rincé 3 fois. Les tendons sont ensuite montés sur le dynamomètre avec un support adapté pour l'appareil AFM. Ce support permet d'obtenir une plage de balayage à sa surface avec une tension appliquée sur l'échantillon puis maintenue à l'aide d'un second ancrage à vis (Figure 9). L'échantillon est ensuite asséché dans cette position puis soumis au balayage AFM.

4.9- L'imagerie par AFM des fibres de collagène

Les images AFM en mode contacte sont fait sur un Bioscope (Veeco) à l'aide d'une pointe de nitrure de silicium sur un cantilever triangulaire MLCT-AUHW (Veeco) d'une constante de ressort de 0,03 N/m. Généralement, l'approche et l'alignement de la pointe sur l'échantillon se fait par le microscope inversé situé sous l'AFM. Ensuite, on engage le balayage AFM avec une force de contact de 2 Volt. Les paramètres sont ajustés en fonction de l'échantillon afin de maximiser la qualité de l'image. Finalement nous procédons à l'analyse fibrilles de collagène en mesurant la distance moyenne entre chacun des chevauchements et intervalles (Figure 7).

4.10- Culture des cellules endothéliales

Les cellules utilisées sont de la ligné EAhy 926 (EDGELL *et al.*, 1983). Ce sont des cellules endothéliales vasculaires de cordon ombilical humain (HUVEC) immortalisées par fusion avec une ligné de cellules tumorale A549 initialement isolées d'un carcinome alvéolaire. Les cellules EAhy 926 présente un phénotype endothélial maintenu après de nombreux passages. Les cellules sont cultivées dans des flasques de 75 cm² contenant 15 mL de milieu DMEM (Wisent) supplémenté de sérum fœtal bovin 10 % (FBS de Wisent) de L-glutamine 2 mM (Wisent), des antibiotiques pénicilline 100 U/mL (Wisent), streptomycine 100 µg/mL (Wisent) et amphotéricine B 2,5 µg/mL (Wisent) ainsi que de supplément de croissance pour cellules endothéliales 30 µg/mL (ECGS de BD). Le DMEM commercialement disponible et utilisé pour la propagation contient 25 mM de glucose. Les cellules sont portées à confluence et passées par trypsinisation environ une fois par semaine.

4.11- Exposition chronique des cellules au glucose

Nous avons préparé à partir de DMEM sans glucose (Wisent) des milieux contenant 5 mM, 40 mM et 80 mM de glucose (Wisent). Les cellules sontensemencées dans des flasques de 75 cm² contenant 15 mL de milieu DMEM décrit à la section précédente et à différentes concentrations de glucose. Les cellules sont gardées en croissance et trypsinisées au besoin avec changements de milieu fréquents afin de maintenir la concentration de glucose. Suite à deux passages aux différentes concentrations de glucose, les cellules sont menées à confluence pour les expériences subséquentes. Au total, les cellules sont exposées aux différentes concentrations plus deux semaines et sont maintenues dans ces conditions sur trois à quatre semaines. Le contenu en AGE est divisé après chaque division cellulaire et s'accroît entre les divisions.

4.12- Caractérisation de la glycation cellulaire par immunofluorescence

Les cellules des différents groupes (concentrations de glucose) sontensemencées sur des lamelles dans des plaques à 6 puits et menées à confluence. Les cellules sont rincées et fixées par un traitement au paraformaldéhyde 4 % dans une solution de PBS pH 7,4 contenant 0,2 % de Triton X-100 pour perméabiliser les cellules pendant 10 min puis rincées avec une solution de Tris 10 mM pH 7,4 contenant 0,1 % Triton X-100 (3x). Les cellules sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire de souris anti-AGE (CosmoBio) à 1 µg/mL pendant 2h à la température de la pièce puis rincées. On marque avec l'anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé au fluorophore Alexafluor 488 (Molecular Probe) 1/200 pendant 1h et les cellules sont rincées. On ajoute du Hoechst (Sigma) 260 µg/mL un marqueur de noyaux et de la phalloïdine 5 U/mL couplée au

Texas Red (Molecular Probe) qui marque le cytosquelette d'actine pendant 20 min puis les cellules sont rincées une dernière fois. Les lamelles sont recouvertes de Vectashield (Vector Laboratories) et scellées avec du vernis. Les échantillons sont finalement observés à l'aide d'un microscope à épifluorescence (Zeiss Axiovert 200M) avec des filtres d'excitation et d'émission de 350 – 461 nm, 495 – 519 nm et 589 – 615 nm pour le Hoechst, l'Alexafluor 488 et le Texas Red respectivement.

4.13- Lysat cellulaire

Les cellules sont menées à confluence dans des boîtes de Pétri de 10 cm. Elles sont rincées au PBS afin de retirer le milieu de culture puis grattées délicatement du fond du plat de Pétri et pipetées dans un tube de 1,5 mL pour être centrifugées 10 min à 200 G à 4°C. Le surnageant est retiré pour ajouté le tampon de lyse contenant du Tris 10 mM pH 7,4 et des inhibiteurs de protéases Complete Mini (Roche) en gardant les échantillons sur glace pendant 15 min suivit de 2 sonifications de 10 s à 1 watts. Une seconde centrifugation à 16 000 G pendant 10 min à 4°C permet d'obtenir le lysat total dans le surnageant.

4.14- Électrophorèse des protéines

Les lysats cellulaires sont traités avec du tampon de chargement 63mM Tris, 2% SDS, 10 % glycérol 0,01 bleu bromophénole pH 6,8 (Fermentas) et du DTT (Fermentas) 0,1M à 95°C pendant 5 minutes puis chargées sur un gel de polyacrylamide 12 % contenant 0,1% de SDS pour en faire l'électrophorèse. Afin de suivre la migration des protéines et de déterminer le poids moléculaire des bandes à la fin de l'expérience, un marqueur de poids

moléculaire (Fermentas) est également chargé sur le gel. L'électrophorèse à 30 mA est optimale après 2h.

4.15- Immunobuvardage de type Western du récepteur RAGE.

Le transfert des protéines contenues dans le gel séparateur se fait à 100 V sur une membrane de PVDF pendant 1h30. La membrane est par la suite bloquée pendant 2h dans une solution contenant 5% de lait en poudre à la température de la pièce. La réaction avec l'anticorps primaire, anti-RAGE de chèvre (Abcam) 1/100, se fait pendant la nuit à 4°C puis la membrane est rincée 3 fois afin de minimiser les réactions non spécifiques de l'anticorps. La membrane est ensuite soumise à l'anticorps secondaire, un anti-IgG de chèvre obtenue du lapin et couplé à une enzyme HRP (Sigma) 1/4000, pendant 2h à la température de la pièce et rincée à nouveau. On procède ensuite à la détection par un ajout d'un mélange de luminol et peroxyde d'hydrogène (Perkin-Elmer) qui émet de la lumière lorsqu'il est dégradé par l'enzyme HRP. La lumière émise peut être captée par un film photo pour ECL (Amersham) en chambre noire.

4.16- Les expériences de spectroscopie de force sur cellules endothéliales

Les cellules sont menées à confluence dans des boîtes de Pétri de 6 cm. Avant chaque expérience, le milieu de culture est remplacé par une solution HBSS contenant 20mM d'HEPES, 120mM de NaCl, 5,3mM de KCl, 0,8mM de MgSO₄, 1,8mM de CaCl₂ et la concentration de glucose requise puis ajustée à pH 7,4. Les pointes et cantilevers utilisées sont fait de nitrure de silicium (Veeco MLCT-AUHW) sans modification chimique et d'une constante de ressort nominale de 0,01 N/m. La constante de ressort est remesurée

par analyse de l'amplitude du bruit thermique (BUTT *et al.*, 1995; HUTTER *et al.*, 1993) à chaque expérience puisqu'une caractérisation de celle-ci permet une calibration précise de l'appareil. La pointe est finalement utilisée afin de sonder les cellules 5 fois chacune. L'analyse des différentes courbes d'approches par la méthode de Hertz (OBERLEITHNER *et al.*, 2006; RADMACHER *et al.*, 1996) se fait par une distribution statistique Gaussienne sur le logiciel Igor Pro.

4.17- Préparation des agonistes AGEs

Des agonistes AGEs sont préparés selon la méthode de glycation thermique (BHATWADEKAR, 2005) à partir d'une solution stérile d'albumine de sérum bovin (Wisent) à 50 mg / mL avec ou sans glucose (Sigma) 0,5 M et avec ou sans lysine (Sigma) 0,1 M dans un tampon PBS pH 7,4. Ces trois solutions (BSA, AGE-BSA et AGE-BSA-Lys) sont incubées pendant 4 jours à 50°C. Suite à l'incubation, les solutions sont dialysées à l'aide d'une membrane de cellulose (Fisher) laissant passée les molécules de moins de 12 à 14 kDa dans une solution de PBS pH 7,4 pendant la nuit à 4°C. Le glucose résiduel est contrôlé dans les solutions AGE-BSA et AGE-BSA-Lys par un glucomètre (AccuCheck Roche). Les solutions sont congelées à -20°C suite à la dialyse pour les conservées.

4.18- Caractérisation des agonistes AGEs

Puisque certaines structures de AGEs ont une autofluorescence, il est possible de caractériser la formation de AGEs dans les différentes solutions par spectrofluorométrie (Hitachi). Nous effectuons le spectre d'émission à une longueur d'onde d'excitation

typique à l'autofluorescence des AGEs (370 nm) des solutions à une concentration d'environ 0,5 mg/mL dans du PBS pH 7,4. Le maximum de fluorescence émise est environ à 440 nm. La concentration protéique est déterminée par la méthode BCA (Sigma) afin de normaliser le signal de fluorescence.

Une seconde caractérisation des agonistes formés est effectuée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide 7 % et SDS 0,01 %. L'électrophorèse se fait par la même méthode décrite pour l'électrophorèse du récepteur avec une concentration d'environ 50 µg/mL des solutions. Suite à l'électrophorèse, le gel séparateur est rincé à l'eau distillée 3 fois pendant 10 min puis coloré à l'aide d'un colorant de protéine Gel Code (Pierce) 30 min et finalement rincé une seconde fois (3 x 10 min). La migration différentielle des ligands formés est analysée en corrélation avec la migration du marqueur de poids moléculaire (Fermentas).

4.19- Expériences de stimulation aux AGEs des cellules endothéliales par microscopie à contraste de phase

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de Pétri de 6 cm contenant 4 mL de milieu de culture et menées à confluence. On change le milieu de culture des cellules par 5 mL de HBSS avant l'expérience. Les cellules sont ensuite observées par microscopie à contraste de phase (Zeiss Axiovert 200m) en enregistrant des images à toutes les 10 sec. Nous effectuons une observation de base pendant 5 min puis on ajoute 500 µL de solution BSA, AGE-BSA ou AGE-BSA-Lys à environ 50 mg/mL et on observe la réaction des cellules pendant 25 minutes.

5- Résultats

5.1- Évaluation globale de la déformation de fibres de collagène sous un stress en fonction de l'élongation

La glycation des protéines se présente sous différents aspects. La réticulation des protéines de structures par les AGEs représente un aspect majeur de l'impact de la formation de produits de glycation dans le cadre d'une étude des composantes d'un tissu vasculaire. Le collagène est l'une des protéines qui compose principalement la tunique externe des artères et des veines. L'effet de la réticulation du collagène se manifeste dans ses propriétés mécaniques. Pour bien comprendre comment évaluer les propriétés mécaniques, nous avons effectué l'analyse de courbes d'élongation de fibres de collagène par dynamométrie. Avec cet instrument, il est possible d'étirer des fibres de collagène (Élongation %) tout en mesurant le stress auquel les fibres sont soumises (Stress MPa) (Figure 12). Les courbes comportent 4 phases. Premièrement, un régime de déformation à faible force appelé la région « Toe » (Figures 12, 1). Cette phase comprend les premiers 5 à 6 % de l'élongation des tissus, mais représente la majorité des élongations physiologiques (BARBUCCI, ; HAMMER, 2007; PROVENZANO *et al.*, 2001). Ensuite, le tendon se déforme de façon linéaire par rapport au stress appliqué, il s'agit de la phase de déformation élastique (Figure 12, 2). Ici, les différents niveaux de structures du collagène interagissent à la manière d'un ressort cylindrique. De plus, les déformations dans cette phase sont généralement réversibles.

Dans la phase linéaire, le tissu de collagène répond à la loi de Hooke par l'équation suivante :

$$\sigma = E \varepsilon \quad \text{Équation 5}$$

Où σ est la contrainte mécanique (Stress), E le module de Young et ε la déformation (Élongation). De façon mathématique, la pente de la phase linéaire élastique est le module de Young des fibres de collagène. Lorsque sa valeur est faible, le module de Young représente une caractérisation de l'élasticité du matériel ou à l'inverse, lorsque sa valeur est élevée, il représente sa rigidité. Typiquement, on remarque ensuite une diminution de la pente de la phase linéaire (Figure 12, 3). Ceci correspond à la phase de déformation plastique qui est irréversible. Finalement, on note la rupture des fibres qui est représentée par une chute du stress appliqué (Figure 12, 4). D'un point de vue physiologique, dans un tissu de collagène, les paramètres de rupture et le module de Young représentent des cas extrêmes d'élongations par exemple dans des cas d'entorse ou de déchirures de ligaments.

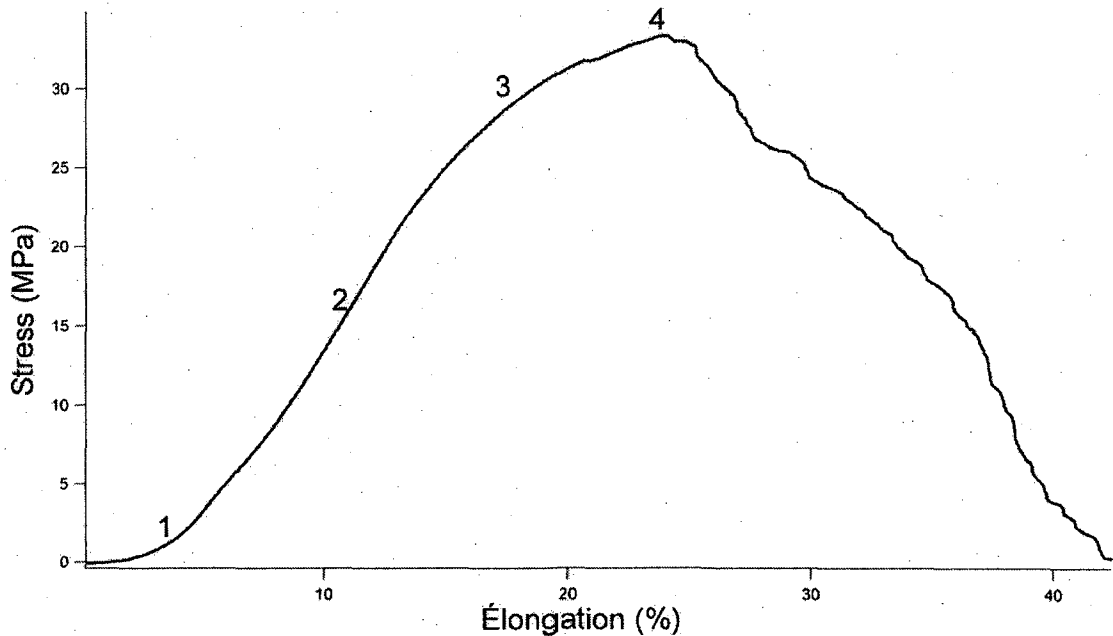


Figure 12 : Courbe de rupture de fibres de collagène.

Courbe de rupture typique de tendon exprimée selon le stress appliqué en fonction de l'élongation. La courbe représente une courbe de rupture d'un tendon natif. Le chiffre 1 indique la région « Toe » qui est un régime de déformation non linéaire. Le 2 représente la déformation élastique linéaire, 3 le plateau est la déformation plastique et 4 le point de rupture.

5.2- Évaluation de l'impact de la réticulation sur la déformation de fibres de collagène en fonction du stress

Notre hypothèse de base est que les AGEs causent la réticulation des protéines comme les fibres de collagène changent leurs propriétés mécaniques. Afin de démontrer l'impact mécanique de la réticulation sur les tissus de collagène, nous avons utilisé un système de réticulation non biologique : le glutaraldéhyde. Cet agent est bien connu pour ses capacités à réticuler les tissus biologiques (NEETHLING *et al.*, 2003). Nous avons analysé différentes courbes d'élongation de fibres de collagène traitées au glutaraldéhyde en comparaison à des tissus non traités. Ceci nous permet l'observation des effets de la

réticulation sur les tissus de collagène. La figure 13-a présente des courbes typiques du stress en fonction de l'élongation de fibres de collagène natives et réticulées au glutaraldéhyde. Nous avons mesuré le point de rupture de ces courbes pour évaluer l'effet du traitement au glutaraldéhyde. La réticulation des fibres de collagène augmente le stress maximal qu'elles peuvent soutenir avant de briser passant de 19 ± 3 MPa pour les fibres natives à 31 ± 7 MPa pour celles réticulées (Figure 13, c). Par contre, la réticulation diminue la capacité à déformer le tissu de collagène. Les élongations enregistrées aux points de rupture passent de 24 ± 2 % pour les fibres natives à 17 ± 3 % après réticulation (Figure 13, b). De plus, une courbe de rupture typique de tissu traité au glutaraldéhyde présente la phase « Toe » et la phase linéaire suivit immédiatement par le point de rupture, mais la phase de déformation plastique est absente (Figure 13, a). Ceci suggère que la réticulation affecte la mécanique de rupture normale.

La pente de la phase linéaire est l'expression de l'élasticité du matériel que l'on appelle le module de Young (Figure 14, a). Le calcul du module de Young moyen sur les fibres natives est de 119 ± 14 MPa et augmente à 226 ± 20 MPa suivant le traitement au glutaraldéhyde (Figure 14, b). Il y a donc une augmentation de la rigidité dans les tissus de collagène réticulés. En résumé, les tissus réticulés semblent supporter un stress plus important, mais brise à une élongation beaucoup plus faible ce qui implique qu'ils sont moins facilement déformables d'où leur augmentation de la rigidité exprimée par le module de Young.

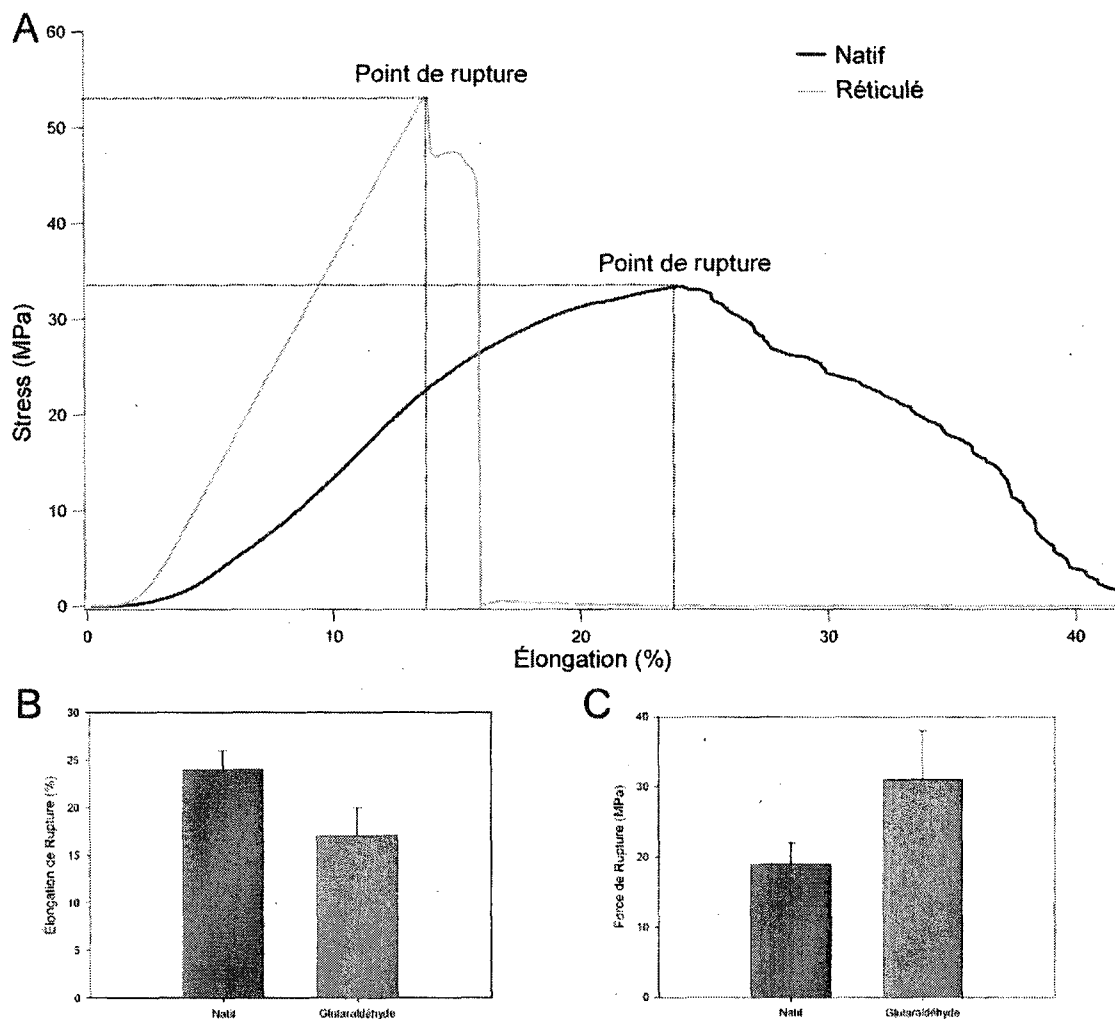


Figure 13 : Mesures des points de rupture des fibres de collagène

A) Courbes de ruptures typiques des fibres de collagène exprimées selon le stress appliqué en fonction de l'élongation. La courbe en noire représente une courbe de rupture d'un tendon natif et la grise un tendon réticulé. La courbe de rupture des tissus réticulés ne présentent pas de phase plastique. B) Les mesures des élongations de rupture du groupe natif et traité au glutaraldéhyde 4 %. Les tendons réticulés permettent une élongation moins importante et est totalement dépourvue de phase de déformation plastique et brise à cette valeur d'élongation. (Moyenne \pm SEM $p=0,05$ $N=4$) C) Les mesures des forces de rupture du groupe natif et traité au glutaraldéhyde 4%. Les tendons réticulés brisent à des forces plus importantes que les natifs et la rupture est franche contrairement aux natifs qui semblent maintenir un stress résiduel sur une longue élongation. (Moyenne \pm SEM $p=0,08$ $N=4$)

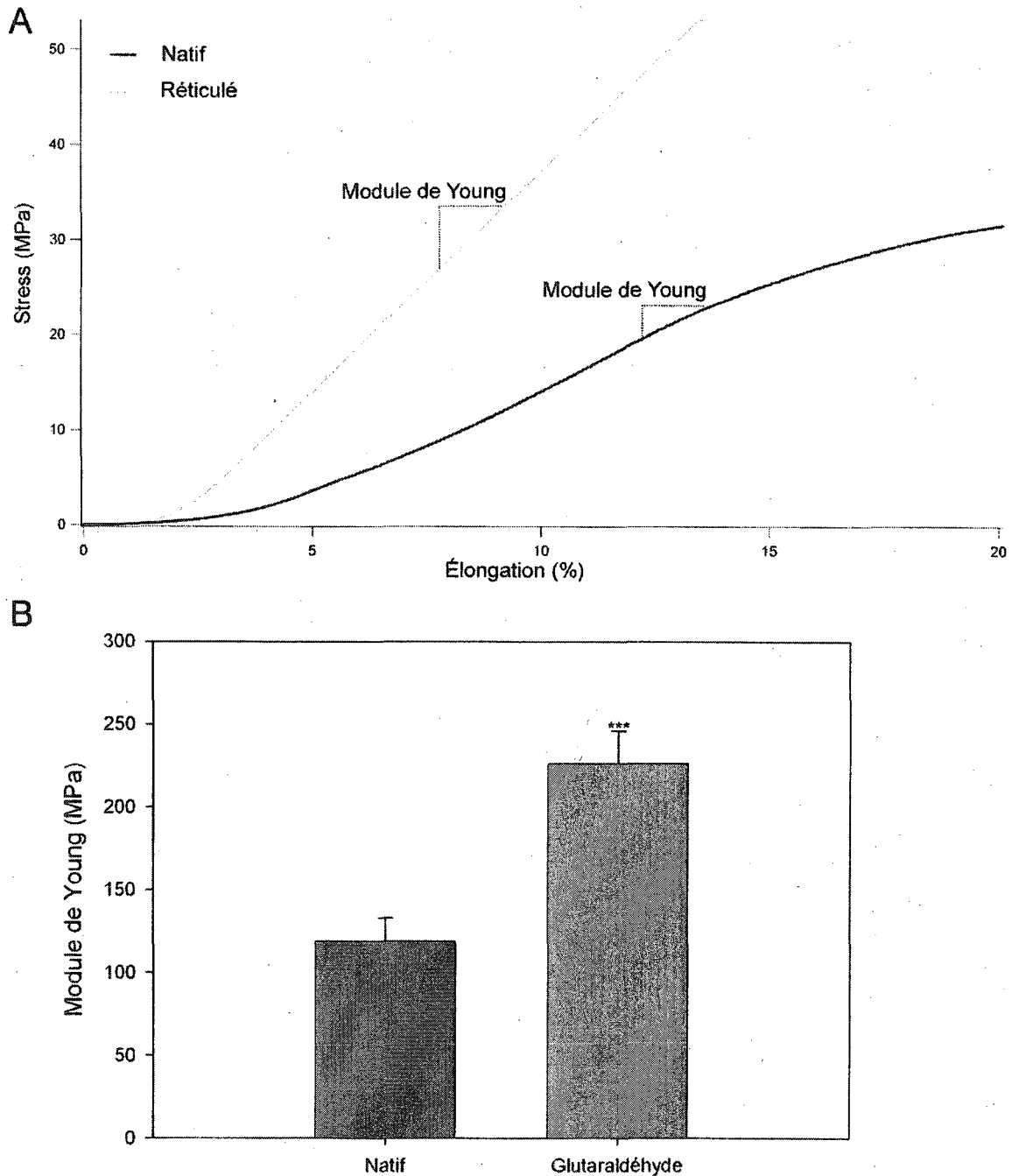


Figure 14 : Mesures des modules de Young des fibres de collagène

A) Courbes typiques d'élongation de fibres de collagène avant rupture. Le module de Young est la pente maximale dans le régime élastique linéaire. Il s'agit d'une caractérisation de la rigidité des fibres de collagène. B) Mesures des modules de Young du groupe natif et traité glutaraldéhyde 4%. La réticulation augmente la rigidité des tendons. (Moyenne \pm SEM, N = 7, $p < 0,001$)

5.3- Évaluation de la vitesse de relaxation

La réticulation augmente la rigidité des tissus de collagène, mais comment celle-ci se manifeste dans les différents niveaux de structures? Les différents phénomènes permettant la déformation des fibres de collagène comprend entre autre le glissement entre les fibrilles. Les interactions interfibrilles sont généralement non covalentes. La force appliquée aux fibres de collagène est transmise aux fibrilles qui glissent les unes sur les autres puisque aucune liaison covalente n'interfère dans leur mouvement. Cette mécanique permet, suite à l'élongation de la structure, de relâcher le stress durant une période de temps ce qui s'apparente à un aspect de viscosité des tissus de collagène. Notre hypothèse est que la réticulation forme des liaisons covalentes qui stabilisent les structures touchées. Nous avons effectué des expériences de dynamométrie afin de mesurer la relaxation des tissus traités au glutaraldéhyde. La figure 15a présente des courbes de relaxation suite à l'application d'un stress dans la phase élastique de 4 MPa en fonction du temps. Dans un contexte de modèle de réticulation de tissus vasculaire, nous avons calculé la vitesse de relaxation suite à la mesure de la chute de stress (Figure 15, a ΔF) sur la première seconde de relaxation (Figure 15, a ΔT) pour entrer dans une dynamique de fréquence cardiaque. La vitesse de relaxation moyenne des fibres natives passe de 268 ± 11 kPa/s à 64 ± 12 kPa/s suite au traitement au glutaraldéhyde. Les tissus réticulés relaxent donc beaucoup moins rapidement que les tissus natifs (Figure 15-B). Ceci implique que le phénomène de glissement entre les fibrilles est grandement diminué par la réticulation. La formation de liaisons covalentes rend le tissu moins apte à se distancer pour abaisser le stress appliqué. La réticulation fusionne les différents niveaux de structures qui n'interagissent plus comme des entités indépendantes mais plutôt comme une seule et unique fibre.

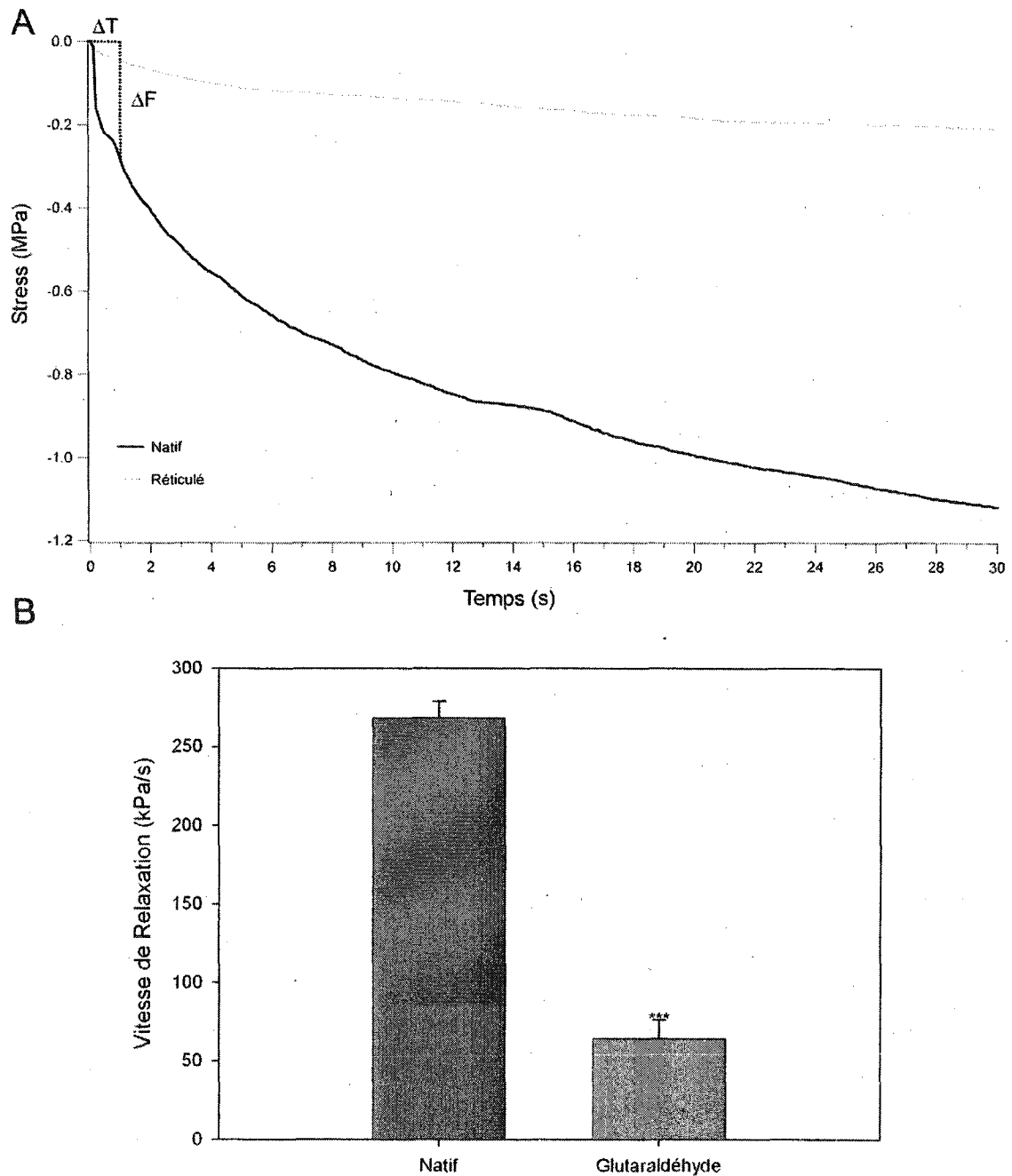


Figure 15 : Mesures des vitesses de relaxation de fibres de collagène

A) Courbe typique de la relaxation des tendons en fonction du temps. Afin de calculer la vitesse de relaxation, on divise ΔF par ΔT . Avant de mesurer la relaxation un même stress initial de 4 MPa est appliqué aux échantillons ce qui correspond à la phase élastique de l'élongation. B) Mesures des vitesses de relaxation du groupe natif et traité au glutaraldéhyde 4 %. On observe une relaxation beaucoup moins importante des tendons lorsque ceux-ci sont réticulés. (Moyenne \pm SEM, N = 4, $p < 0,001$)

5.4- Évaluation de l'énergie de déformation de la région « Toe »

Nous avons finalement mesuré l'impact de la réticulation sur le régime de déformation de la phase « Toe ». Cette phase est présente dans les premiers 5 à 6 % de l'élongation, mais se situe dans une gamme de force inférieure à la phase élastique. La phase « Toe » comprend pourtant la majorité des événements d'élongations physiologiques (BARBUCCI, ; HAMMER, 2007). Nous avons dans ce cas-ci porté en graphique le stress en fonction de l'allongement nominal de l'échantillon (Figure 16, a). Ceci nous permet la mesure de l'aire sous la courbe de la déformation de la phase « Toe » avec des unités définies de la façon suivante :

$$\text{Pascal} \times \text{mètre} = \frac{\text{Newton}}{\text{m}^2} \times \text{mètre} = \frac{\text{Joule}}{\text{m}^2} \quad \text{Équation 6}$$

Nous associons l'aire sous la courbe à une énergie de déformation, une quantité d'énergie nécessaire à déformer un cylindre d'un mètre carré de surface axiale. Le traitement de fibres de collagène par le glutaraldéhyde augmente considérablement leur énergie de déformation passant de $22 \pm 1 \text{ J/m}^2$ pour les tissus natifs à $43 \pm 2 \text{ J/m}^2$ après la réticulation (Figure 16, b). On peut imaginer qu'un tissu réticulé nécessite donc près de deux fois plus d'énergie pour être déformé.

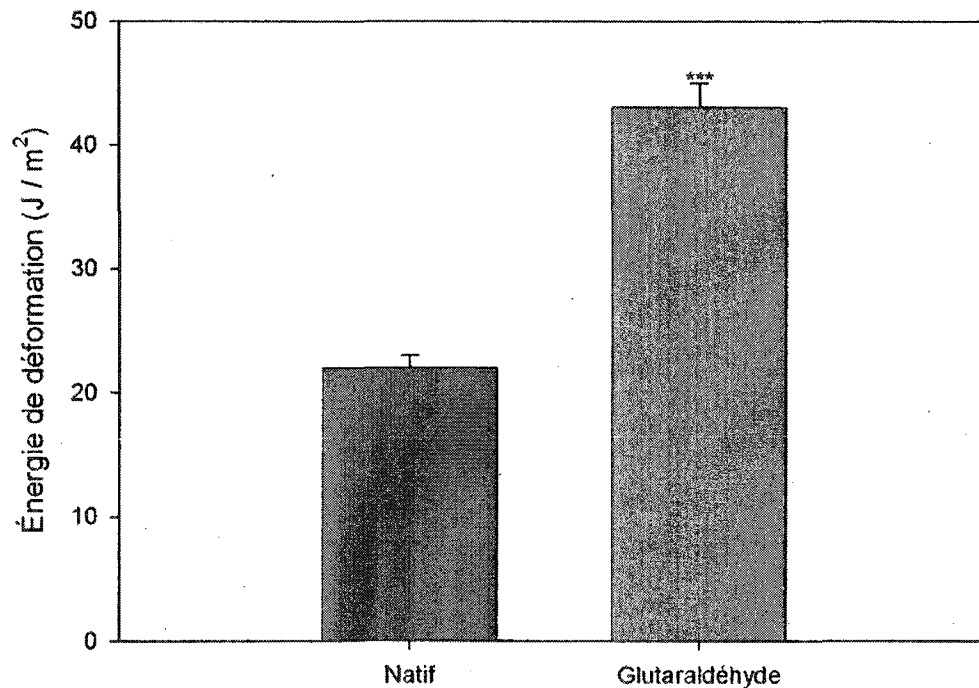
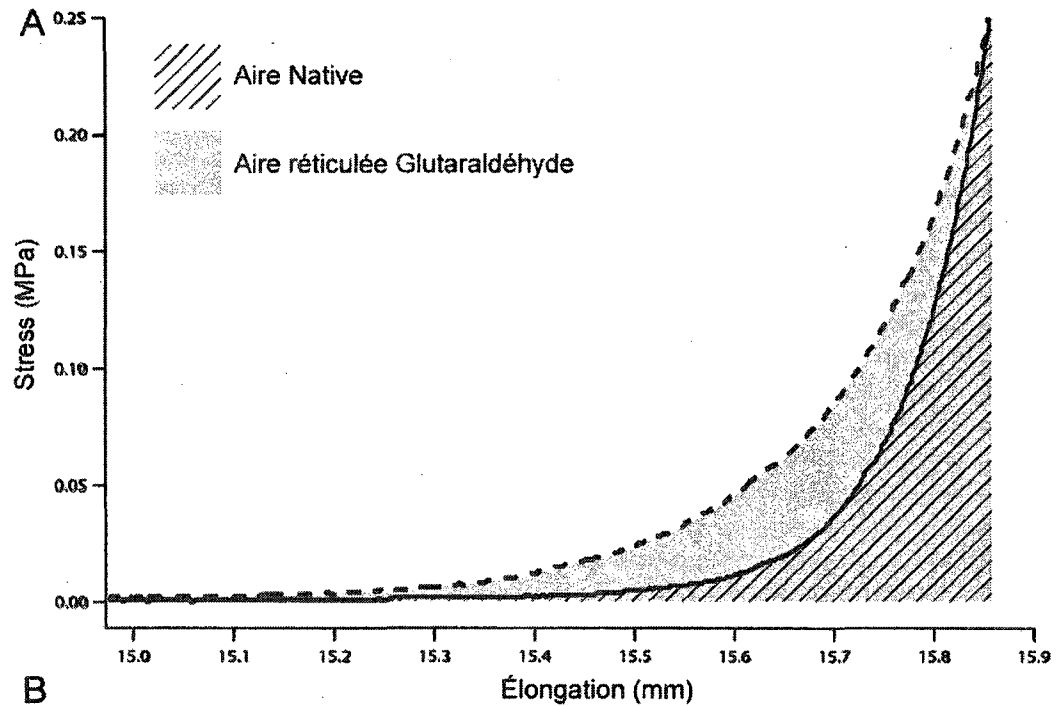


Figure 16 : Mesures de l'énergie de déformation des fibres de collagène

A) Courbes typiques stress dans la région « Toe » d'élongation non linéaire. L'aire sous la courbe représente l'énergie nécessaire à la déformation des structures au repos. B) Mesures de la force de déformation du group natif et traité au glutaraldéhyde 4 %. Les tendons réticulés requièrent une force supérieure pour leur déformation. (Moyenne \pm SEM, N = 6, $p < 0,001$)

5.5- Évaluation globale des paramètres mécaniques de tendons réticulés dans un modèle de réticulation par le glutaraldéhyde

Nous avons suggéré que la réticulation causée par les AGEs avait un impact sur les propriétés mécaniques des fibres de collagène. Afin de vérifier cette hypothèse, nous avons dans un premier temps effectué des traitements des tissus de collagène au glutaraldéhyde, ce qui représente un modèle de réticulation positive. La réticulation induit un changement sur les propriétés mécaniques des tissus de collagène. La figure 17 présente l'effet du glutaraldéhyde sur les différents paramètres mécanique étudiés. Nous observons en moyenne une augmentation de 63 % de la force de rupture, une diminution de 30 % de l'élongation de rupture, une augmentation de 90 % du module de Young, une diminution de 73 % de la vitesse de relaxation et une augmentation de 87 % de l'énergie de déformation suite au traitement au glutaraldéhyde. La mesure de ces paramètres mécaniques de déformation représente une validation du modèle de réticulation et de son impact sur les propriétés mécaniques du collagène. Les AGEs causent eux aussi la réticulation du collagène. Notre hypothèse suivante concerne donc toujours l'impact de la réticulation, mais cette fois-ci induit par les AGEs.

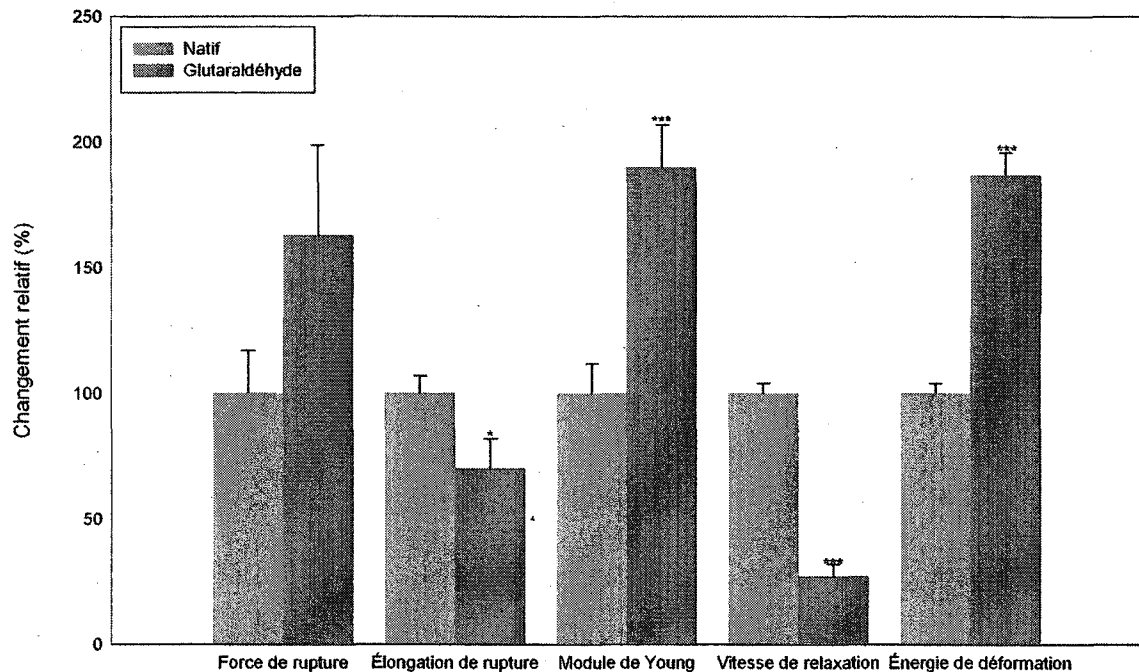


Figure 17 : Histogramme des impacts de la réticulation sur les fibres de collagène

Changements relatifs de la vitesse de relaxation, l'élongation et la force de rupture, le module de Young et l'énergie de déformation avant et après un traitement au glutaraldéhyde 4 % qui est un agent réticulant puissant. Toutes ces propriétés mécaniques des tendons sont affectées par la réticulation. (Moyennes relatives aux moyennes natives \pm SEM relatives à leur moyenne N entre 4 et 7 * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$)

5.6- Évaluation globale des paramètres mécaniques de tendons réticulés dans un modèle de réticulation par les AGEs *in vivo* chez des souris diabétiques

Pour évaluer l'impact de la réticulation par les AGEs, nous avons effectué la mesure de différents paramètres mécaniques de tendons prélevés sur des souris de types sauvages et des souris qui développent un diabète de type 1. Dans des cas d'hyperglycémie pathologiques, il y a une augmentation des AGEs et de la réticulation causée par ceux-ci (GENUTL *et al.*, 2005; KILHOVD *et al.*, 2007). Notre hypothèse est que la réticulation causée par les AGEs chez les souris diabétiques affecte les paramètres mécaniques de leurs tissus de collagène comme dans le modèle de réticulation au glutaraldéhyde (Figure 18). Effectivement, nous observons que la force de rupture augmente en moyenne de 54 %, l'élongation de rupture diminue de 21 %, le module de Young augmente de 77 %, la vitesse de relaxation diminue de 38 % et que l'énergie de déformation augmente de 13 % (Figure 18). En accord avec notre modèle de réticulation positive au glutaraldéhyde, la réticulation des tissus de collagène par les AGEs dans des cas des cas d'hyperglycémies pathologiques affecte les propriétés mécaniques de ces tissus. Le collagène étant une composante majeure des vaisseaux sanguin comme les artères et les veines, nous suggérons que la réticulation peut affecter de façon similaire les vaisseaux sanguins dans des cas d'hyperglycémies pathologiques comme le diabète.

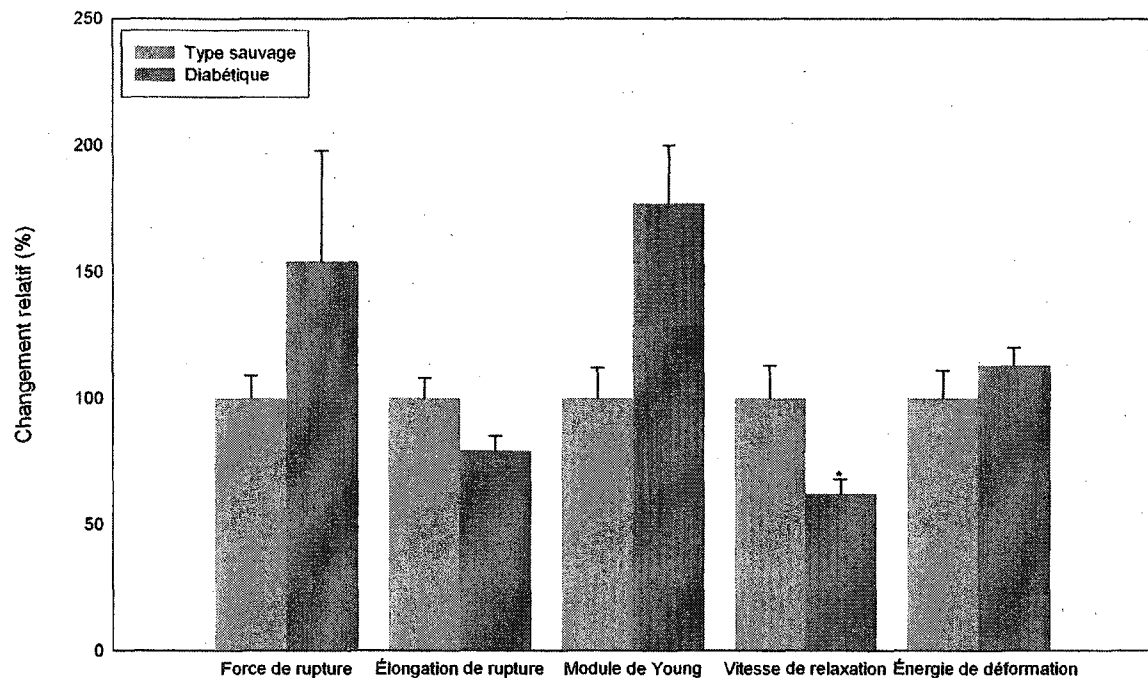


Figure 18 : Histogramme des impacts de la réticulation par les AGEs dans un modèle *in vivo* de souris diabétiques

Les changements relatifs des différents paramètres mécaniques mesurés sur des tendons de souris diabétiques et de type sauvage. La force et l'élongation de rupture, le module de Young, la vitesse de relaxation et l'énergie de déformation sont affectée par la réticulation par les AGEs.

(Moyennes relatives aux moyennes natives \pm SEM relatives à leur moyenne * $p < 0,05$)

5.7- Évaluation de l'impact de la réticulation des AGEs dans un modèle de traitement au glucose *ex vivo* sur des tendons

Nous avons par ailleurs évalué la réversibilité de la réticulation causée par les AGEs. Plusieurs contraintes expérimentales nous permettent difficilement d'effectuer la totalité des mesures mécaniques pour l'évaluation de la réversibilité. Dans un premier temps, l'élongation de tissus de collagène hétérogènes rend les paramètres tels l'énergie de déformation très variables. Nous voulons donc mesurer l'évolution des effets des différents traitements sur un même tissu et ainsi obtenir des données comparables à ses propriétés d'origine. Par contre, l'élongation des fibres de collagène dans la phase élastique peut causer des changements irréversibles qui peuvent modifier les propriétés mécaniques. Nous avons limité les observations à la phase « Toe » par la mesure de l'énergie de déformation sur chacun des tissus après chaque traitement. La phase « Toe » représente tout de même la région d'intérêt physiologique.

Afin de mesurer l'effet de la réticulation par les AGEs sur la mécanique des fibres de collagène dans la phase « Toe », nous avons traité de façon artificielle des tendons extraits de queue de rat avec une solution contenant 0,5 M de glucose. Nous avons d'ailleurs contrôlé la présence de AGEs sur ces tendons par immunofluorescence grâce à un anticorps anti-AGE révélé par un anticorps secondaire couplé à l'Alexafluor 488. La figure 19 présente différents tendons ayant subi le traitement au glucose ou une incubation dans une solution sans glucose (groupe natif). Les colonnes présentent des images prises par les différents modes de microscopie optique soit en contraste de phase à la lumière blanche ou en fluorescence par excitation des fluorophores avec une lumière à

une longueur d'excitation des fluorophores. La dernière colonne présente la superposition des deux images. La couleur verte est l'image de fluorescence. Les rangées présentent les différents traitements imposés aux échantillons. La rangée natif montre un tissu qui a été incubé dans une solution sans glucose (Figure 19, a). On détecte une fluorescence basale de ce tissu. Cette fluorescence peut être non spécifique ou endogène (Figure 19, b et c). Par contre, lorsque le tissu est traité au glucose (Figure 19, d), il y a une augmentation significative de la formation de AGEs détectés par fluorescence (Figure 19, e et f). La dernière rangée présente le montage sur lame de microscope de deux tissus de collagène ayant subi les deux différents traitements, le natif à gauche et le traité au glucose à droite (Figure 19, g). Ceci nous permet d'évaluer qualitativement la hausse de la formation des AGEs sur les tissus suivant un traitement au glucose (Figure 19, h et i).

Nous avons par la suite mesuré l'énergie de déformation des tissus et la conséquence des différents traitements. La figure 20 présente tout d'abord les courbes typiques de déformation d'un tissu par le stress en fonction de l'élongation nominale dans la phase « Toe » avant tout traitement (Figure 20, a ligne noire), après la réticulation au glucose (Figure 20, a ligne en tiret) et après un traitement au PTB, un agent briseur de réticulation (Figure 20, a ligne pointillée). La mesure de l'aire sous ces différentes courbes montre l'évolution de l'énergie de déformation dans ce tissu suite à un traitement réticulant et le renversement de cet effet par un agent briseur de réticulation. L'histogramme de la figure 20b affiche les mesures relatives d'énergie de déformation des tissus évalués en fonction de leur état natif rapporté à 100 % dans la première

colonne. La colonne contrôle correspond à des tissus qui ont subi une incubation dans une solution sans glucose. Nous n'avons observé aucun changement significatif de leur énergie de déformation. La colonne glucose présente l'effet de la réticulation par les AGEs suite à un traitement au glucose. La réticulation augmente de façon significative l'énergie de déformation de 45 % en moyenne. Finalement, la colonne PTB présente une diminution significative d'environ 35 % de l'énergie de déformation suite à un traitement par un agent briseur de réticulation. Ces résultats nous permettent deux conclusions. Premièrement, il est possible de renverser l'effet de la réticulation par un agent pharmacologique. De plus, puisque le PTB est un agent briseur de réticulation spécifique aux groupements dicarbonyles présents sur certaines structures de AGEs réticulées, son action sur les tissus de collagène traité au glucose implique qu'il y a réticulation par les AGEs. Les fibres de collagène peuvent donc être réticulées par le glucose ce qui affecte leur capacité à se déformer sous la pression. Puisque le collagène est une protéine structurelle importante dans les vaisseaux sanguins, sa réticulation peut augmenter la résistance à déformation du tissu vasculaire sous la pression sanguine. Cette résistance à la déformation représente la compliance des vaisseaux qui est la capacité de ceux-ci à s'expandre en réponse à une augmentation de pression. Les agents briseurs de réticulation sont en mesure de rétablir en partie la compliance.

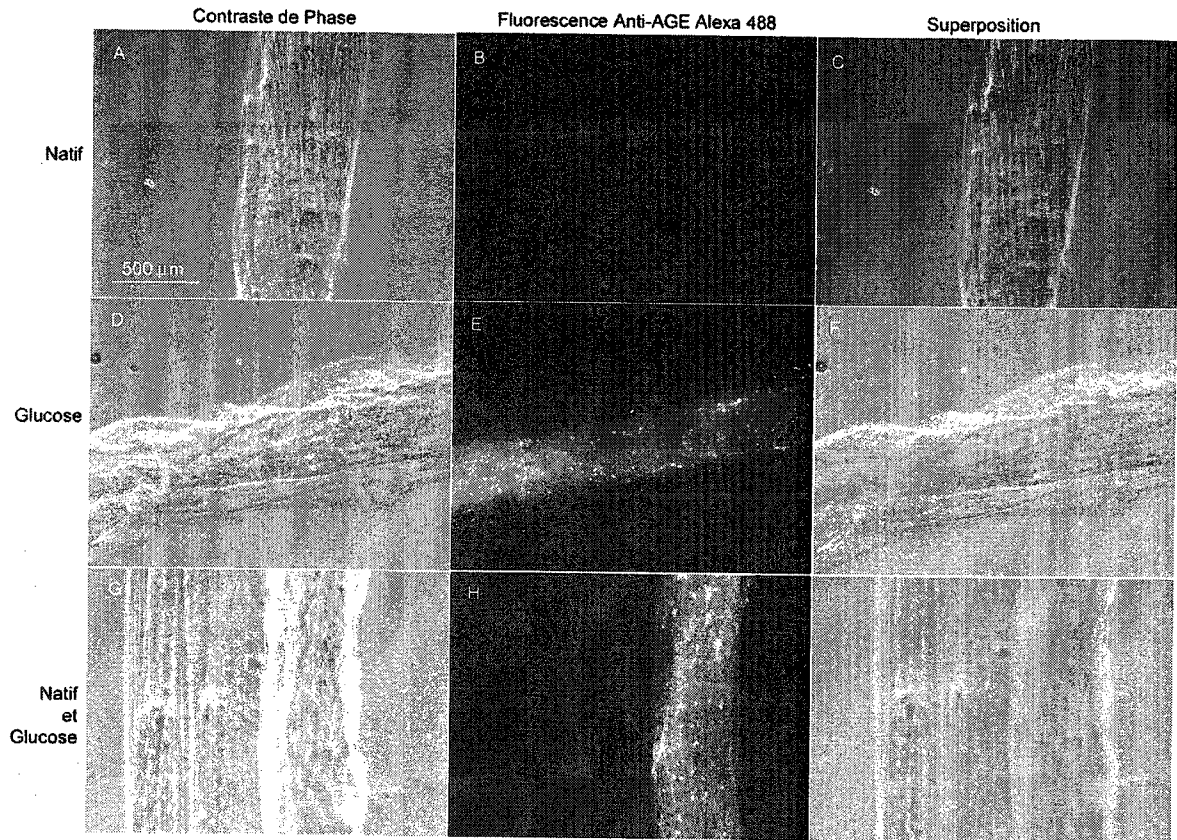


Figure 19 : Caractérisation de la glycation sur des tendons par immunofluorescence

A) Tendon non traité en contraste de phase et B) en immunofluorescence des AGEs révélée par le fluorophore Alexafluor 488. C) Image superposée de la fluorescence sur le contraste de phase. Lorsque le tendon est traité au glucose (D à F) on observe une augmentation de la fluorescence due aux AGEs. G à I présente un montage sur lame d'un tendon traité au glucose à droite juxtaposé à un non traité à gauche.

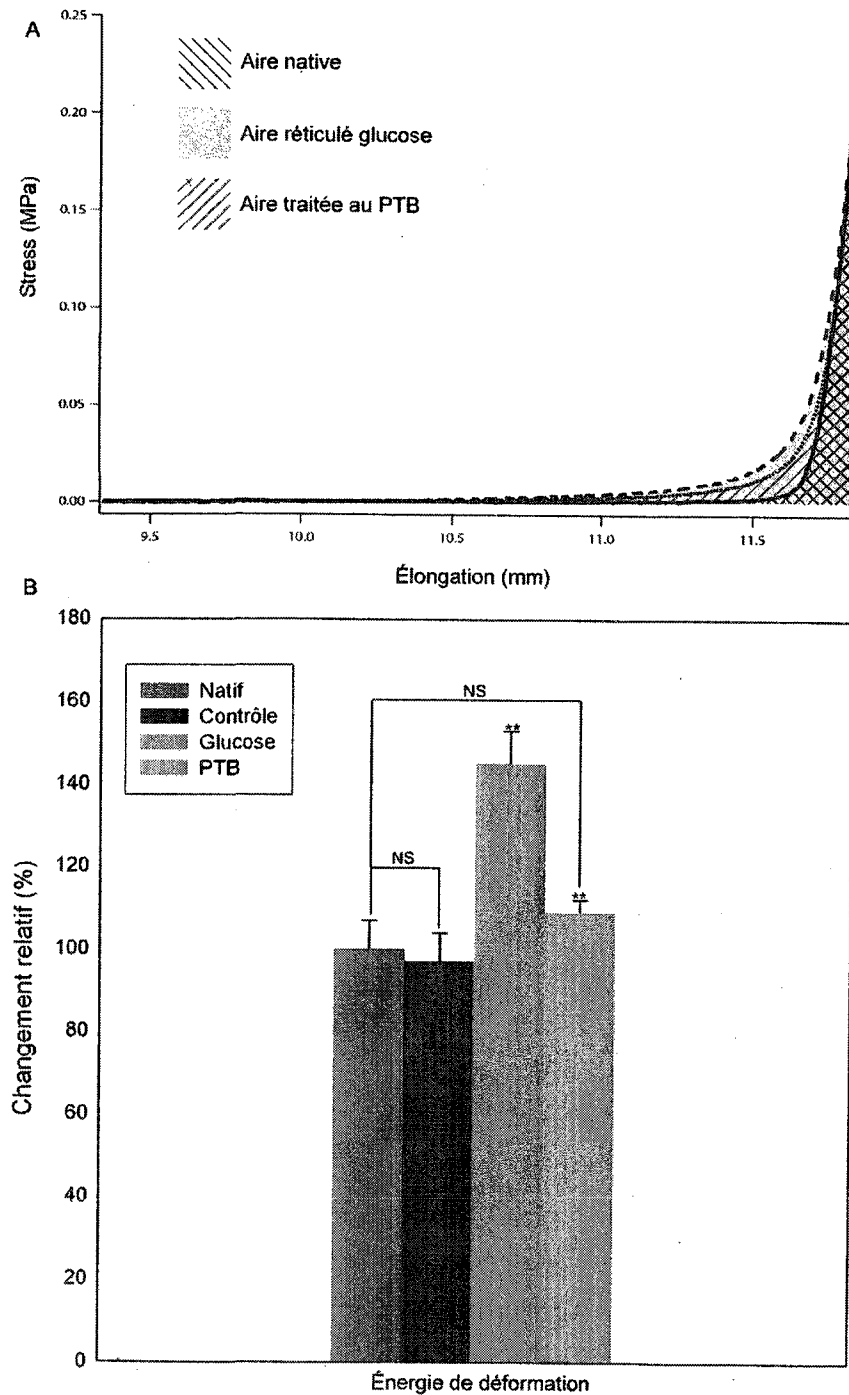


Figure 20 : Mesures de l'énergie de déformation dans un modèle *ex vivo*

A) Courbes typiques de la phase « Toe » de tendons traités au glucose. L'aire sous la courbe représente la mesure de l'énergie de déformation des tendons avant et après avoir été traité au glucose suivi d'un traitement au PTB. B) Le contrôle représente des tendons qui étaient incubés dans du PBS sans glucose. La réticulation des AGEs sur les tendons semble augmenter la force de déformation d'environ 50 %. Un second traitement PTB, un agent briseur de réticulation, semble rétablir en partie la force de déformation. (Moyennes relatives aux natives \pm SEM relatives à leur moyenne $N = 6$ $p < 0,01$)

5.8- L'imagerie par AFM de fibres de collagène

Afin de mieux comprendre de quelle façon l'élongation des fibres de collagène se répercute sur leurs niveaux de structure, nous avons effectué de l'imagerie à haute résolution par microscopie à force atomique de fibrilles de collagène sur des tendons extraits de queue de rat. Ceci peut nous permettre de déterminer l'origine moléculaire de l'étirement des fibrilles de collagène et révéler la localisation de la réticulation. Les images AFM sont des topographies (3 dimensions) de la surface balayée à l'aide d'une pointe nanoscopique. La dimension de hauteur est donnée par une échelle de couleurs de noir à blanc. Les couleurs foncées représentent les points les plus profonds et les couleurs pâles les points les plus surélevés (Figure 21). Une plage balayée comprend plusieurs fibrilles généralement orientées de façon parallèle (Figure 21, flèches blanches). Sur chacune de ces fibrilles il est possible d'observer une répétition de creux et de bosses. C'est structures sont associées aux intervalles et chevauchements ayant une périodicité typique d'environ 67 nm (Figure 21, annotations de 67 nm).

Pour mesurer l'impact de l'application d'un stress ou une élongation sur les niveaux de structures moléculaires du collagène, nous avons mesuré la périodicité des fibrilles sous une tension. La figure 22 présente une série d'images AFM de fibrilles de collagène à une élongation nulle (Figure 22, a 0%), à une élongation de 3 % (Figure 22, b) et de 7% (Figure 22, c). Lorsque l'on applique une tension sur les tendons, nous pouvons moduler la périodicité sur les tendons ce que l'on observe principalement par l'augmentation des zones foncées (Figure 22, b et c) qui sont associé aux intervalles. Les intervalles ont une densité moins élevée et offrent donc moins de résistance à la déformation que les

chevauchements. Ceci explique pourquoi ce sont eux qui prennent de l'expansion et non les intervalles (Figure 7). Pour déterminer le changement de périodicité moyen, l'analyse longitudinale sur les fibrilles permet l'évaluation de la distance entre la succession d'intervalles et de chevauchements. Dans la figure 22, nous avons mesuré 10 répétitions (Figure 22, a à c, flèches rouges). La périodicité passe d'environ 66,7 nm à 69,3 nm à une élongation de 3 % puis à 70,3 nm à une élongation de 7 %. Le graphique à la figure 22d présente la corrélation entre l'augmentation de la périodicité en fonction de l'élongation. Le second axe vertical représente l'augmentation relative de la périodicité. L'expansion de la périodicité atteint un plateau autour de 6 % d'élongation. Les mesures de périodicité sur des tissus sous tension suite à un traitement réticulant se sont avérées pour l'instant peu concluantes. Nous ne pouvons pas déterminer avec certitudes que la réticulation affecte le phénomène d'expansion moléculaire. Par contre, l'expansion moléculaire des monomères de collagène lors d'une élongation peut être associée à une grande partie de la phase « Toe » puisque ce phénomène atteint un plateau à 6 %.

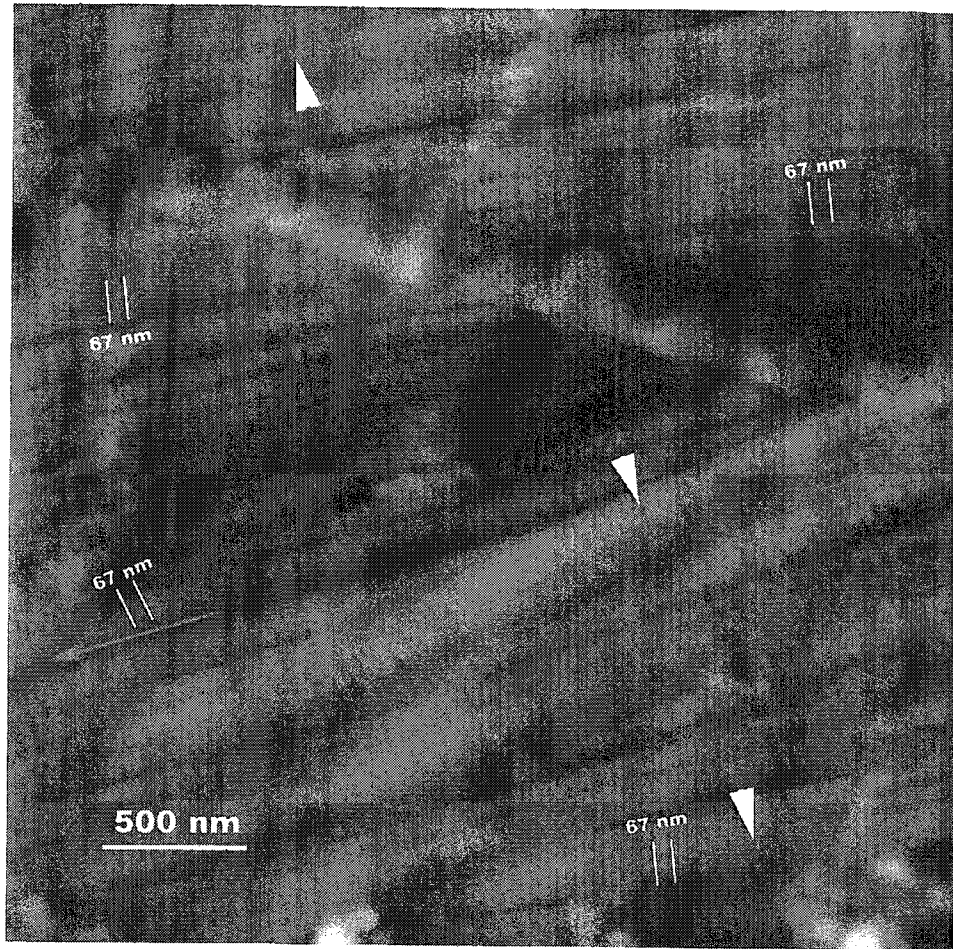


Figure 21 : Topographie AFM de fibrilles de collagène

L'image présente une topographie de la surface d'un tendon. On peut y observer plusieurs fibrilles qui ont un diamètre d'environ 150 nm (Flèches blanches). Sur chacune de ces fibrilles, on discerne une répétition de creux et de bosses associées aux intervalles et chevauchements selon un patron répétitif de 67 nm. La flèche rouge indique le sens général des fibrilles.

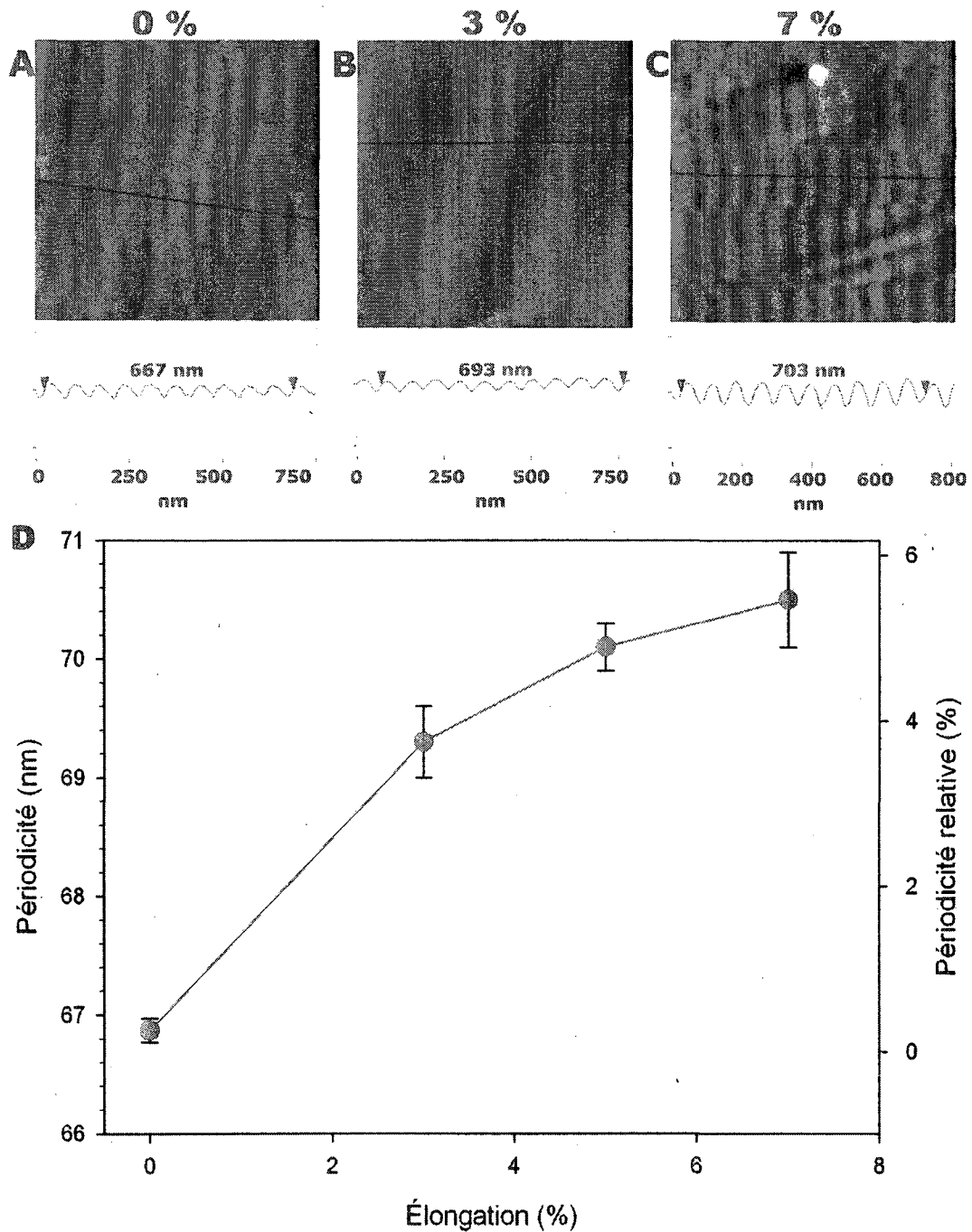


Figure 22 : Analyse de la structure des fibrilles par AFM

Les fibrilles de collagène présentent des intervalles et des chevauchements selon un patron répétitif. A) Lorsque l'on observe des fibrilles de collagène soumises à aucun stress on mesure (flèches rouges) un patron répétitif d'environ 67 nm. Les fibrilles de collagène soumises à un stress de 3 % (B) ou 7 % (C) présentent une périodicité d'environ 69 nm et 70 nm respectivement. D) La corrélation entre la périodicité en fonction de l'élongation appliquée sur le tendon.

5.9- Réticulation des cellules endothéliales

Dans un second lieu, nous nous sommes intéressés à l'effet que peut avoir les AGEs sur l'endothélium, un second élément important dans le système sanguin. Nous avons étudié la mécanique membranaire de l'endothélium dans un modèle de cellules endothéliales en culture exposé à un traitement réticulant. Tout d'abord, afin d'évaluer l'impact de la réticulation sur les cellules endothéliales, nous avons utilisé le modèle de réticulation au glutaraldéhyde. Pour ce faire, des cellules natives ou traitées au glutaraldéhyde sont sondées à l'aide d'une pointe AFM par spectroscopie de force. On mesure la déflexion du cantilever en écrasant les cellules avec la pointe (Figure 23, a). La déflexion peut être convertie en force selon la constante de ressort du cantilever. La figure 23a présente tout d'abord une courbe typique lors du contact avec une surface rigide non déformable comme le fond d'une boîte de Pétri (Figure 23, a, *noire*). La courbe d'approche sur cellules natives représente une surface beaucoup plus souple (Figure 23, a, *courbe bleue foncée*). Suite à un traitement réticulant au glutaraldéhyde, les cellules exhibent une surface beaucoup plus rigide et beaucoup moins déformable (Figure 23, a, *courbe bleue pâle*). Afin de calculer la rigidité de la surface membranaire, nous mesurons la force de déflexion 300 nm après le point d'inflexion au contact entre la pointe et la cellule (Figure 23, a ΔF). Cette force permet la mesure d'un module de Young qui caractérise la rigidité membranaire. L'histogramme de la figure 23 présente l'effet de la réticulation par le glutaraldéhyde sur le module de Young. Le glutaraldéhyde augmente le module de Young de 1057 ± 31 Pa pour les cellules natives à 4726 ± 383 Pa après le traitement. La réticulation affecte donc grandement les propriétés mécaniques des membranes cellulaires.

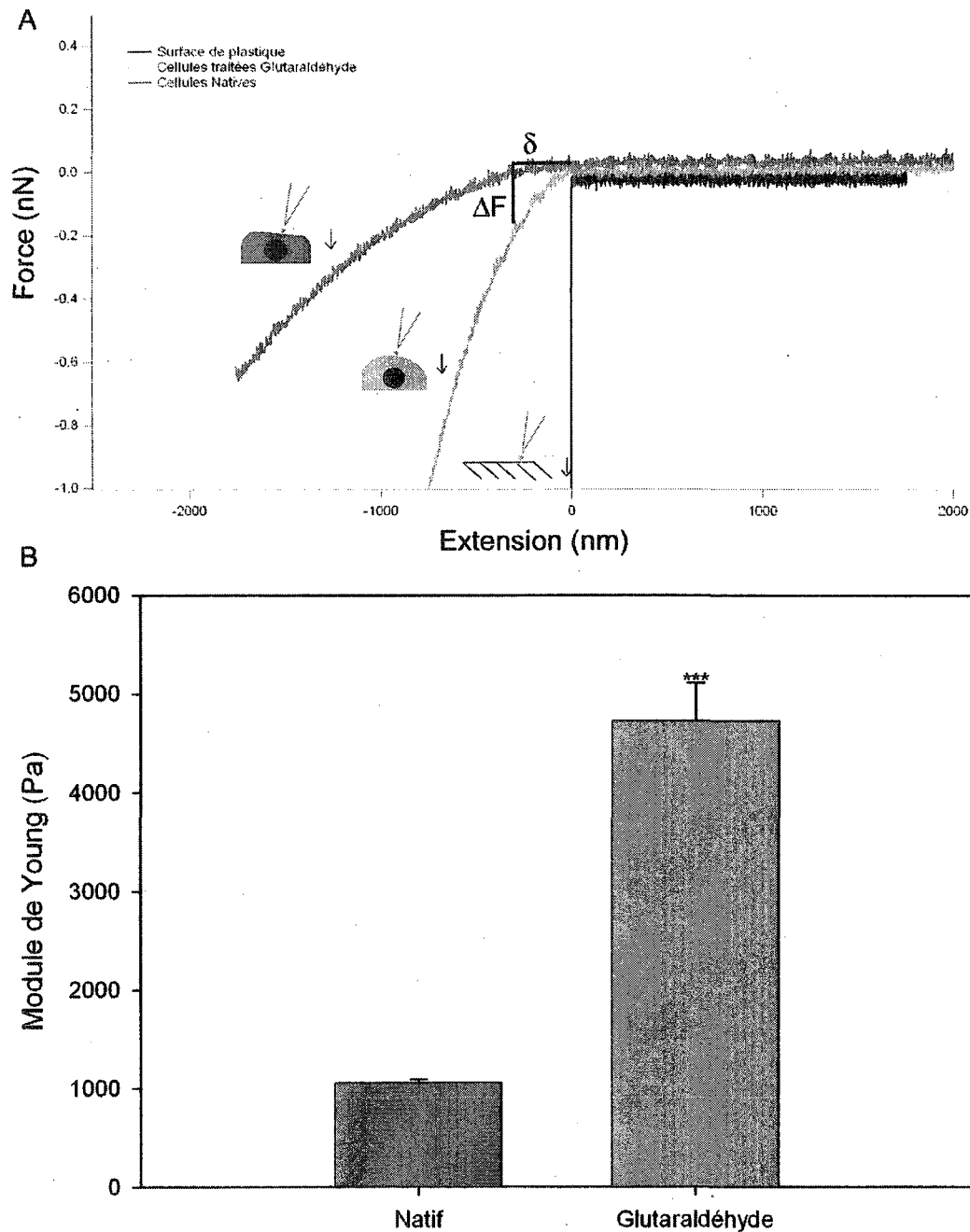


Figure 23 : Mesures du module de Young de cellules endothéliales

A) Courbes d'approches de la surface, la bleu foncée une surface cellulaire souple, la bleu pâles une surface cellulaire après un traitement au glutaraldéhyde et la noire une surface rigide. La mesure du module de Young des membranes cellulaire des EAhy 926 se fait par spectroscopie de force. Nous avons effectué un contrôle positif de l'effet de la réticulation par un traitement glutaraldéhyde 80mM. ΔF représente la force mesuré à distance $\delta = 300$ nm pour calculé le module de Young selon le modèle de Hertz (Équation 2). B) La rigidité de la membrane est augmentée d'un facteur cinq suite à ce traitement. (Moyenne \pm SEM N= 20 $p < 0,001$)

5.10- Effet des AGEs sur les cellules endothéliales

Afin de mesurer l'effet de la réticulation par les AGEs sur les propriétés mécaniques membranaires des cellules endothéliales, nous avons exposé les cellules de façon chronique à différentes concentrations de glucose (5 mM, 40 mM et 80 mM) de 2 à 4 semaines. Nous avons contrôlé la formation de AGEs par immunofluorescence suite à une détection par un anticorps anti-AGE (Figure 24). Les différentes images d'épifluorescence de la figure 24 présentent par colonnes les différents marqueurs fluorophores. Nous avons marqué le cytosquelette d'actine à l'aide de la phalloïdine fluorescente (Figure 24, a, e et i), les noyaux par le Hoechst, un agent intercalant l'ADN (Figure 24, b, f et j) et les AGEs par immunofluorescence indirecte à l'aide d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexafluor 488 (Figure 24, c, g et k). La dernière colonne présente la superposition des trois images de fluorescence. Les rangées présentent les différentes concentrations de glucose auxquelles les cellules sont exposées soit de 5 mM, 40 mM et 80 mM. Le group exposé à 5 mM représente les conditions normales de glycémie. Les groupes 40 mM et 80 mM représentent deux conditions d'hyperglycémie. La figure 24c comporte un niveau basal de AGEs. On peut évaluer qualitativement l'accroissement du niveau de AGEs dans les groupes 40 mM et 80 mM dans les figures 24g et k. L'un des éléments cellulaires pouvant modifier les propriétés mécaniques de la membrane est le cytosquelette. Celui-ci est composé entre autre des microfilaments d'actine, des filaments intermédiaires et des microtubules. Nous avons vérifié l'actine puisqu'elle est exprimé par toutes les cellules du corps, elle a une durée de vie cellulaire relativement longue et représente jusqu'à 10 % de la masse protéique des cellules. Nous avons donc évalué la colocalisation entre le cytosquelette d'actine avec les AGEs. Par contre, il ne

semble pas y avoir de corrélation particulière entre les structures d'actine et les AGEs formés (Figure 24, d, h et l). Les AGEs affectent donc probablement d'autres structures que les microfilaments d'actine. Nous n'avons pas tenté de déterminer lesquelles de ces structures étaient effectivement glyquées.

Afin d'évaluer l'impact de la réticulation causée par les AGEs, nous avons effectué la mesure du module de Young sur des cellules exposées de façon chronique à différente concentration de glucose. La figure 25a présente des courbes d'approches typiques qui ont un point d'inflexion plus ou moins abrupt selon la rigidité des cellules. Sur les cellules exposées à de fortes concentrations de glucose, le point d'inflexion est généralement plus abrupt (Figure 25, a bleue pâle et vert) que sur les cellules aux conditions normales de glucose (Figure 25, a bleue foncée). Ceci indique que les cellules exposées à de grande concentration de glucose sont moins facilement déformables que les cellules normales. Le module de Young calculé (méthode d'analyse de Hertz) est significativement plus élevé sur les cellules exposées aux grandes concentrations de glucose passant de 1055 ± 31 Pa pour le group 5 mM à 1418 ± 44 Pa pour le groupe 40 mM et 1572 ± 58 pour le groupe 80 mM (Figure 25, b). Les AGEs peuvent donc causé de la réticulation qui change les propriétés mécaniques des membranes cellulaires suite à l'exposition à des concentrations élevées de glucose. Dans un tissu vasculaire, l'endothélium est lui aussi exposé à de grandes concentrations de glucose dans la pathologie du diabète.

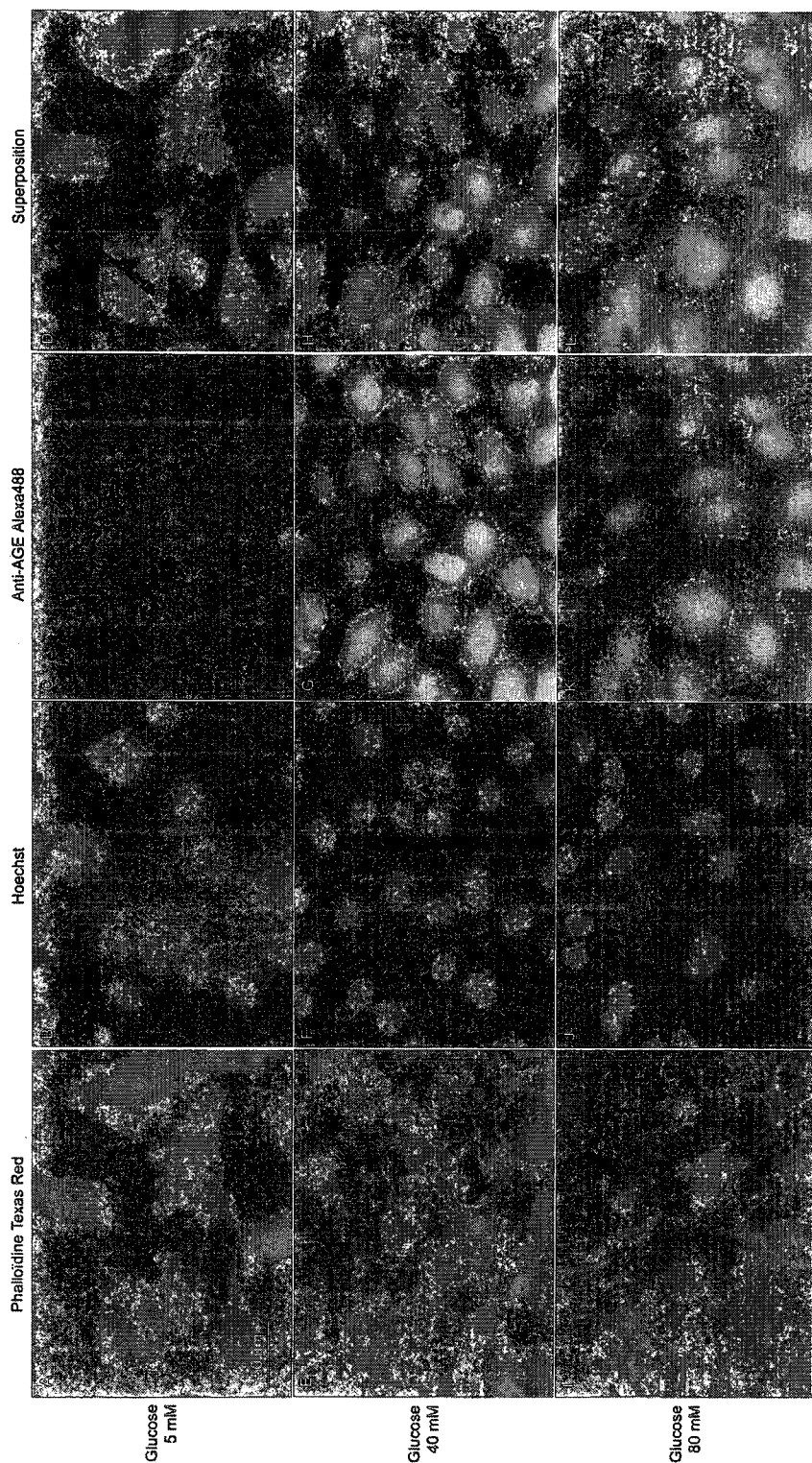


Figure 24 : Caractérisation des AGEs sur cellules endothéliales par fluorescence

Nous avons marqué par des fluorophores de gauche à droite le cytosquelette par la phalloidine Texas Red (A, E et I), le noyau au Hoechst (B, F et J) et les AGEs par immunofluorescence indirecte révélée par l'Alexafluor 488 (C, G et K). Les cellules sont exposées à différentes concentrations de glucose 5 mM, 40 mM et 80 mM. La présence de AGEs est accrue en fonction de la concentration de glucose (C, G et K). La superposition des images (D, H et L) ne montre pas de corrélation particulière entre les structures d'actine et les AGEs. Par contre, les AGEs semblent en grande partie se situer de façon péri-nucléaire et très peu au niveau des jonctions entre les cellules.



A) Courbes d'approches typiques sur cellules selon leur exposition au glucose. On mesure la différence de force à partir du point d'inflexion jusqu'à 300 nm après le contact de la cellule. Ce ΔF permet le calcul du module de Young. B) Variation du module de Young en fonction de la concentration de glucose auxquelles les cellules sont exposées. (Moyenne \pm SEM N= 100 *** $p < 0,001$ * $p < 0,05$)

5.11- Les phénomènes qui affectent les propriétés mécaniques de la membrane

Afin de bien isoler le phénomène de la réticulation nous avons identifié d'autres phénomènes pouvant affecter la mécanique membranaires dans notre système d'exposition chronique à de fortes concentrations de glucose soit les changements osmotiques et la stimulation continue du récepteur RAGE par la présence augmentée de ligand AGEs. Nous avons donc considéré la possibilité que ces phénomènes pouvaient eux aussi contribuer à un changement mécanique membranaire. Nous avons donc étudié leur effet de façon indépendante.

5.12- L'osmolarité

Pour déterminer si les augmentations de rigidité cellulaire sont causées par les changements d'osmolarité, nous avons effectué une série de mesures par spectroscopie de force sur des cellules à 5 mM de glucose. Par la suite nous avons effectué une seconde série de mesures 3, 6 et 24 heures après un changement de milieu de culture passant de 5 mM à 80 mM de glucose. Il n'y a aucun changement significatif de module de Young à aucun des intervalles de temps mesurés ce qui indique que les changements mécaniques dû aux changements osmotiques, s'ils ont lieu, doivent se résorber dans un délai inférieur à 3 heures et n'interfère pas dans nos mesures de rigidité du modèle d'exposition chronique.

5.13- L'expression du récepteur RAGE

Dans un second temps, la stimulation du récepteur RAGE induit une réponse cellulaire. Une stimulation chronique des cellules endothéliales par une présence accrue de AGEs pourrait causer une réponse continue causant des changements membranaires. Afin de déterminer l'effet d'une stimulation par des agonistes AGEs sur les cellules endothéliales, nous avons en premier lieu vérifié l'expression du récepteur RAGE dans la lignée de cellules endothéliale par immunobuvardage de type Western. Les cellules endothéliales semblent exprimer différentes isoformes du récepteur (Figure 26). Nous n'avons pas tenté d'identifier lesquels des isoformes nous avons détectées, mais nous assumons que la forme complète du récepteur est présente. Les cellules peuvent donc être stimulées par des AGEs.

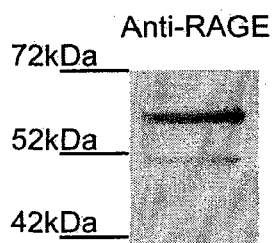


Figure 26 : Expression du récepteur RAGE par les cellules endothéliales

Nous avons vérifié l'expression du récepteur RAGE des EAhy 926 par immunobuvardage de type Western. L'anticorps anti-RAGE semble reconnaître des isoformes de RAGE exprimées par ces cellules.

5.14- Caractérisation des agonistes

Toujours afin d'évaluer l'effet d'une stimulation par les AGEs sur les cellules endothéliale, nous avons préparé deux agonistes AGE et un contrôle à partir d'une solution de BSA selon une méthode de glycation thermique. La caractérisation des agonistes par électrophorèse sur gel de polyacrylamide nous permet de distinguer un retard dans la migration de AGE-BSA versus la BSA seule (Figure 27, a). De la même façon, la migration de l'agoniste AGE-BSA-Lys est retardée versus l'agoniste AGE-BSA et BSA seule. Ces retards de migration peuvent être associés à une augmentation de leur poids moléculaire. Par la mesure de leur migration en corrélation avec celle d'un marqueur de poids moléculaire, on peut évaluer leur poids moléculaire (Figure 27, b). Le poids évalué de la BSA est d'environ 65 kDa. Le poids moléculaire calculé de cette protéine est de 66,43 kDa. Le paramètre important ici est le retard de migration des agoniste BSA modifiés. En effet, on évalue le poids moléculaire de AGE-BSA à environ 67 kDa et celui de AGE-BSA-Lys à 68 kDa. Nous avons donc effectivement modifié la BSA native par une exposition au glucose. Nous pensons que le l'agoniste AGE-BSA forme des structures de AGE beaucoup plus simples comme le CML. Le AGE-BSA-Lys peut former des structures réticulées avec les lysines présentes en solution. Par contre, nous n'avons observé aucun dimère réticulé pour aucun des agonistes préparés. Nous avons évalué la présence de AGEs réticulés et complexes par leur autofluorescence en spectrofluorométrie (Figure 28). Le spectre de fluorescence à une longueur d'onde d'excitation de 370 nm révèle une autofluorescence des AGEs (Figure 3) beaucoup plus élevée pour l'agoniste AGE-BSA (700 RFU/mg de protéine) et d'autant plus pour l'agoniste AGE-BSA-Lys (1100 RFU/mg de protéine) que ne l'est l'autofluorescence

basale de l'agoniste BSA seule (200 RFU/mg de protéine). Ceci indique qu'il y a formation de AGEs sur la BSA lorsqu'elle est exposée au glucose et que l'ajout de lysines en solution permet la formation de plus de AGEs complexes autofluorescents. Pour confirmer la présence de ces AGEs plus complexes on pourrait, par exemple, digérer ces produits formés et effectuer de la spectroscopie de masse pour évaluer la différence entre les fragments de BSA incubés avec ou sans lysines.

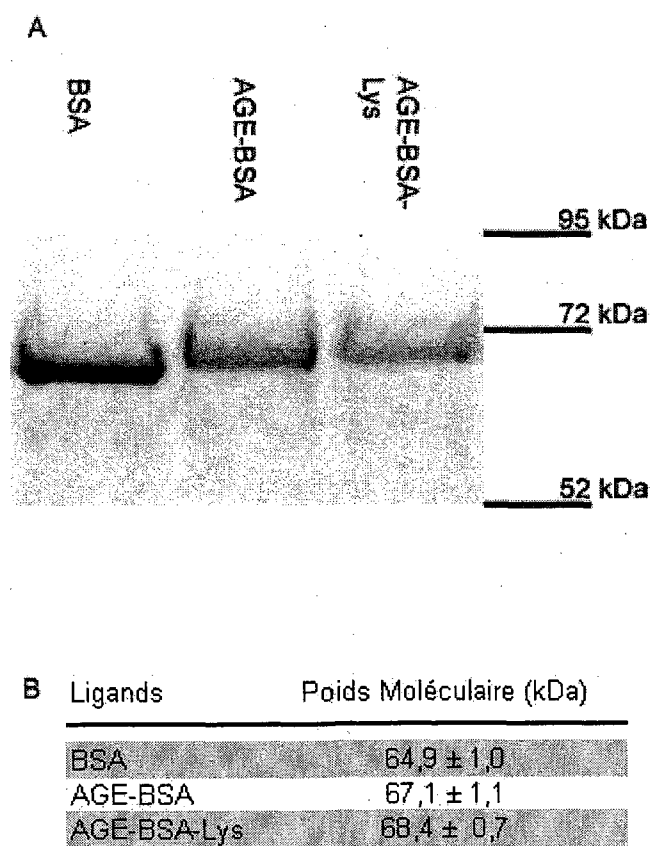


Figure 27 : Caractérisation des agonistes par SDS-PAGE

A) Électrophorèse des agonistes BSA, AGE-BSA et AGE-BSA-Lys marqués par coloration des protéines. On peut observer un retard de la migration de AGE-BSA par rapport à la BSA seule et un léger retard de AGE-BSA-Lys par rapport au AGE-BSA ce qui suggère que leur poids moléculaire a changé tel qu'indiqué en B. (Moyenne \pm SEM N = 3)

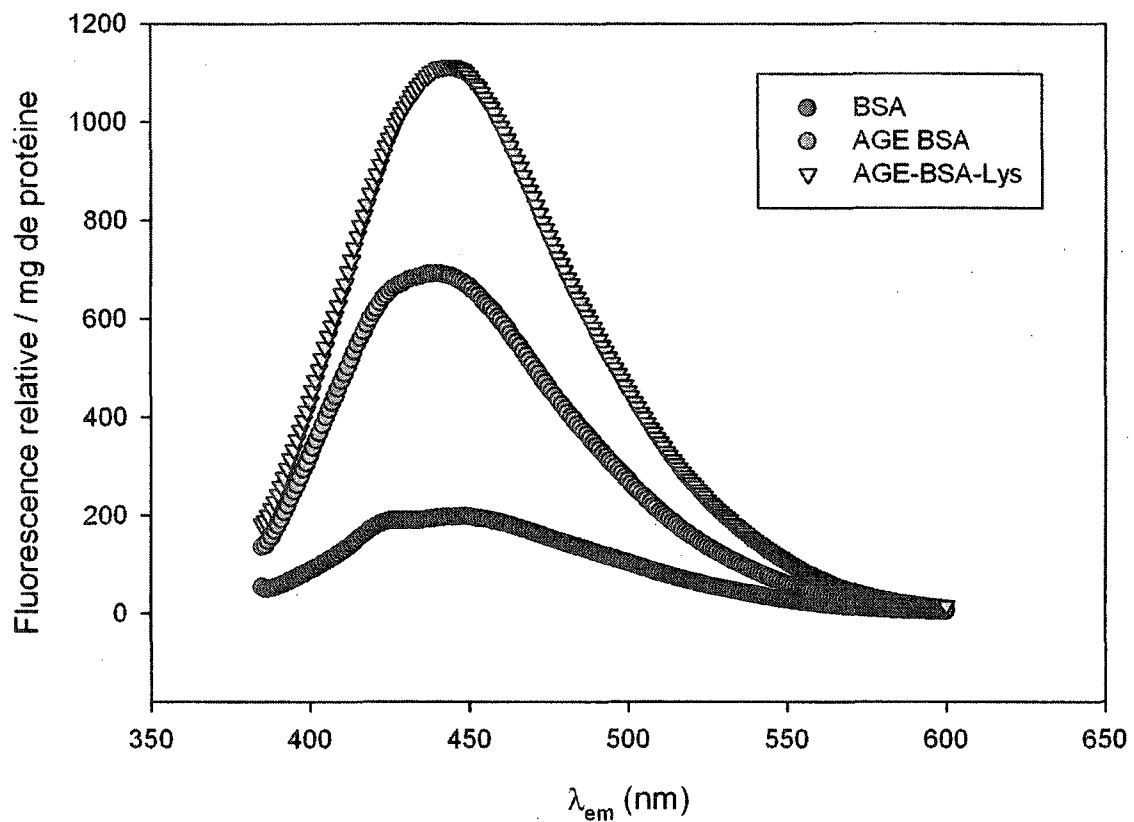


Figure 28 : Caractérisation des agonistes par autofluorescence des AGEs à 370 nm

Le spectre d'émission de la solution AGE-BSA présente une fluorescence relative à la quantité protéique augmentée par rapport à la solution de BSA seule. Celle de AGE-BSA-Lys est d'autant plus augmentée par rapport à AGE-BSA.

5.15- Évaluation des effets des agonistes AGEs sur les cellules endothéliales

Finalement, nous avons observé l'effet qu'ont les agonistes AGEs sur les cellules en culture par microscopie à contraste de phase. La figure 29 présente la morphologie des cellules selon l'agoniste utilisé pour la stimulation. Nous pouvons évaluer qualitativement la morphologie des cellules avant la stimulation, au moment de la stimulation et 25 minutes après la stimulation. L'agoniste contrôle BSA induit très peu d'effet sur la morphologie des cellules (Figure 29, a, b, et c). L'agoniste AGE-BSA induit une forte réponse cellulaire visible par l'augmentation de l'espace intercellulaire (Figure 29, d, e et f). L'agoniste AGE-BSA-Lys induit une réponse modérée, on observe tout de même une augmentation de l'espace intercellulaire (Figure 28, g, h, et i). Les cellules endothéliales réagissent à une stimulation par les AGEs en se contractant. Une stimulation continue pourrait conserver la cellule dans un état de contraction. Cette contraction peut induire une modification de sa rigidité membranaire. Il faudra déterminer le module de Young sur des cellules avant et après la stimulation à des agonistes AGEs.

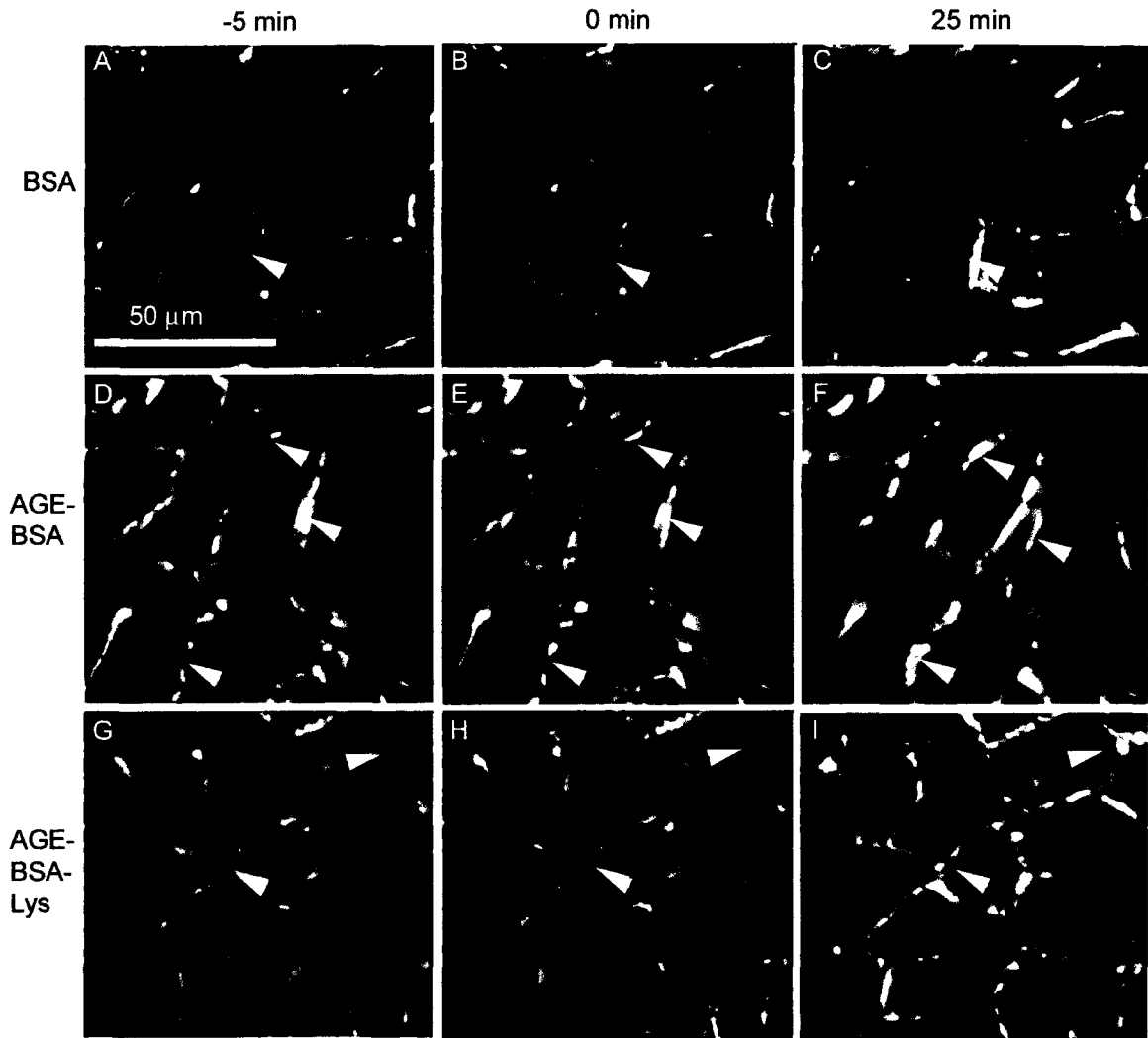


Figure 29 : Effets des agonistes AGEs sur les cellules endothéliales

Images par microscopie à contraste de phase. Les colonnes présentent la morphologie des cellules endothéliales 5 minutes avant l'ajout des agonistes, au moment de l'ajout et 25 minutes après l'ajout. Les rangées présentent les différents agonistes injectés. L'espace entre les cellules augmente suite à l'ajout des agonistes (flèches blanches).

6- Discussion

Afin de comprendre comment les AGEs peuvent affecter les propriétés mécaniques des tissus de collagène, il est important de connaître le mécanisme d'élongation standard de ces fibres. Tout d'abord, il y a au moins trois phénomènes par lesquels les fibres de collagène peuvent subir l'élongation de leur structure (Figure 30). Le premier est le redressement des ondulations (Figure 7, fascicule). Ce phénomène est souvent associé à la phase « Toe ». Rappelons que la phase « Toe » est la phase de fonctionnement physiologique des structures de collagène (BARBUCCI, ; HAMMER, 2007; PROVENZANO *et al.*, 2001). Des modèles suggèrent qu'il y a redressement de toutes structures ondulé dans le tendon pendant la phase « Toe » jusqu'à ce que toutes les structures soient parallèles (FRATZL *et al.*, FREED *et al.*, 2005).). Par contre, plusieurs évidences semblent dissocier le phénomène de redressement à la phase « Toe ». Premièrement, les ondulations semblent disparaître après une élongation atteignant la phase linéaire (HAMMER, 2007), mais la phase « Toe » demeure présente. De plus, les structures sous-jacentes au tendons comme les fascicules ou les fibrilles présentent eux aussi une phase « Toe » (ATKINSON *et al.*, 1999; GRAHAM *et al.*, 2004). Le second phénomène est l'expansion moléculaire des monomères (Figure 7, monomère). On retrouve les monomères dans la structure des fibrilles (Figure 7 et 30). L'application d'un stress peut amplifier leur longueur (FRATZL *et al.*, 1998; FREED *et al.*, 2005). Ceci se reflète par l'augmentation de la périodicité (Figure 22 et 30). Il semble que cette expansion soit associée à la région « Toe » et à la phase linéaire (FRATZL *et al.*, 1998). Le dernier phénomène qui est appliqué à la phase linéaire est le glissement des fibrilles

(Figure 30). Les structures parallèles s'étirent et glissent les une sur les autres pour s'allonger de façon linéaire sous la force en augmentation (Figure 30). Certaines études rapportent qu'une élévation trop importante ou d'une durée excessive dans la phase élastique entraîne des dommages irréparables des tissus comme un allongement de ceux-ci (HAMMER, 2007). Finalement, la phase de déformation plastique est une élévation plus importante que le tissu ne le permet. Elle entraîne des dommages irréversibles aux tissus qui diminuent la cohésion entre les différents niveaux de structure et mènent à la rupture (BARBUCCI, ; FREED *et al.*, 2005; HAMMER, 2007; REDDY, 2004b).

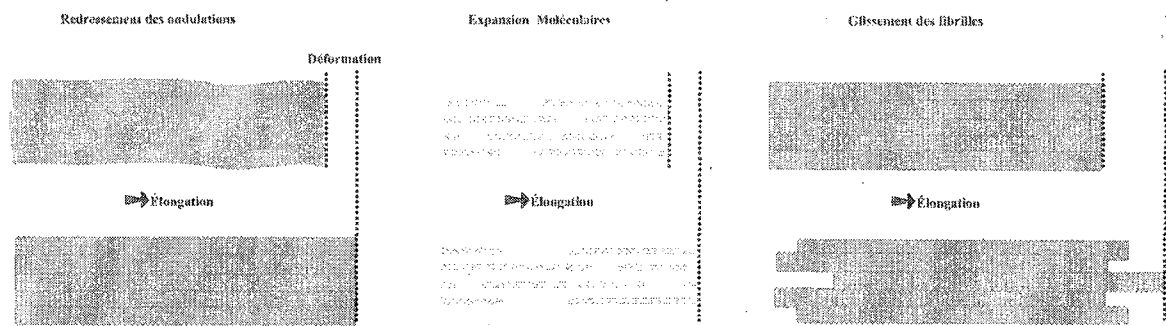


Figure 30 : Phénomènes de déformation axiale

L'élévation des tissus de collagène passe par différents niveaux de structures et implique 3 phénomènes, le redressement de ondulation, l'expansion moléculaire et le glissement des fibrilles.

Il est primordial de comprendre comment la réticulation affecte les diverses propriétés mécaniques des tissus à base de collagène. Le système de réticulation positive au glutaraldéhyde s'est avéré un outil de choix pour la compréhension des divers phénomènes mécaniques affectés par la réticulation. Le glutaraldéhyde n'est évidemment pas physiologique, mais représente tout de même la méthode la plus utilisée pour la réticulation de matrice de collagène dans la production de prothèse (YOSHIOKA *et al.*,

2008). De plus, la réaction de réticulation à l'aide du glutaraldéhyde implique les amines primaires des protéines comme la réaction de glycation tel qu'illustré dans la figure 11b (ENGLERT *et al.*, 2007). Les différentes propriétés mécaniques observées se sont avérées toutes altérées par la réticulation au glutaraldéhyde (Figure 17). En effet, au point de rupture des fibres de collagène réticulées au glutaraldéhyde supportent des forces 63 % plus grande, mais s'allonge 30 % de moins que les fibres natives. Les fibres réticulées sont donc plus solides, mais ne se déforment pas autant ce qui peut se définir comme une augmentation de la fragilité. Les ruptures s'appliquent plutôt à des cas extrêmes d'élongation par exemple les blessures. Il y a d'ailleurs une augmentation des blessures comme les déchirures ligamentaire, les entorses et les fractures osseuses chez des patients atteints de diabète (REDDY *et al.*, 2001; ROSENBLOOM *et al.*, 1983). La réticulation de ces tissus par les AGEs peut être mise en cause. Dans un autre ordre d'idée, la courbe de rupture des fibres réticulées ne comporte aucune phase de déformation plastique. La rupture de ceux-ci se produit à des élongations équivalentes à l'entrée dans la phase plastique des fibres natives, mais toujours à un stress nettement supérieur. De plus la rupture est franche et ne comporte aucun stress résiduel. La rupture des tissus réticulés se fait donc en bloc plutôt que ruptures singulières des microstructures. Lors des expériences, les ruptures des fibres réticulées se produisent généralement à un point d'ancrage contrairement à la rupture des tissus natifs qui se produit par effilochement à partir du centre de l'échantillon. Ceci suggère que la cohésion entre les fibrilles est augmentée par la réticulation. Le nombre de liaisons covalentes à travers le tissu est plus grand ce qui fait que les différents niveaux de structures ont beaucoup plus de points d'attachement les uns avec les autres. Le

phénomène de glissement des fibrilles est d'ailleurs grandement affecté par la formation de liaisons covalentes des réticulations. Nos mesures temporelles suite l'application d'un stress, nous ont permis d'évaluer la relaxation des tissus par le glissement des fibrilles. Nous avons observé une diminution de la vitesse de relaxation passant de 268 ± 11 kPa/s à 64 ± 12 kPa/s suite à un traitement au glutaraldéhyde (Figure 15). Sur des fibres natives, suite à l'application d'un stress, celles-ci peuvent relaxées jusqu'à 70 % du stress initial (KENEDI *et al.*, 1975). Suite à un traitement réticulant par glutaraldéhyde de valve d'aorte, Rousseau *et al.* rapporte une diminution de 60 % de cette capacité de relaxation (ROUSSEAU *et al.*, 1983). La réticulation augmente donc réellement la cohésion entre les structures et atténue le phénomène de glissement fibrillaire. D'un point de vue mécanique, les tissus natifs agissent comme plusieurs ressorts indépendants alors que les tissus réticulés agissent comme un seul ressort (Figure 30). À ce niveau d'organisation moléculaire, on peut imaginer que la transmission d'une onde de pulsation est affectée dans un système vasculaire puisque les structures et molécules sont tous beaucoup plus liées les unes aux autres. On observe d'ailleurs une augmentation de la vitesse de l'onde pulsée dans des cas d'hypertension associé au diabète (JOHNSTONE *et al.*, 2001).

À partir des courbes de rupture, nous avons également calculé le module de Young des fibres de collagène en évaluant la pente de la phase linéaire. Ce paramètre représente en quelque sorte une mesure de la rigidité du matériel. Généralement, les modules de Young rapporté dans la littérature pour des tendons varient entre quelques dizaines à plus d'une centaine de méga pascal (FREED *et al.*, 2005). Nous avons mesuré un module de

Young moyen de 119 ± 14 MPa pour les tendons de rat natif. De plus, la réticulation au glutaraldéhyde amplifie le module de Young à 226 ± 20 MPa (Figure 14). Il y a donc une augmentation considérable de la rigidité des tissus causée par la réticulation. Ceci peut s'expliquer également par l'augmentation de la cohésion entre les fibrilles en les empêchant de glisser les unes sur les autres pour accroître la rigidité de la structure entière du tissu. De plus, ce phénomène peut être associé à l'augmentation de la rigidité artérielle chez les diabétiques (DOGGRELL, 2001).

En résumé, nous avons mesuré l'impact de la réticulation dans un modèle de réticulation positive au glutaraldéhyde sur des fibres de collagène. Nous pensons que ce modèle reflète en partie les effets que la réticulation peut avoir sur des tissus comportant du collagène comme la tunique externe des vaisseaux sanguins. La formation de liaisons covalentes entre les structures du collagène empêche le bon fonctionnement de la mécanique structurelle ce qui peut avoir des impacts directs sur la rigidité des vaisseaux comme les cas d'hypertension associé au diabète. Nous avons validé notre modèle de réticulation non biologique par des expériences sur des tendons réticulés *in vivo* prélevés chez des souris de types sauvages et des souris diabétiques. Les différents paramètres mécaniques sont affectés de la même façon que dans le modèle de réticulation avec le glutaraldéhyde (Figure 17 vs 18). On peut donc affirmer que les AGEs, formés dans des cas pathologique comme le diabète, peuvent causer des réticulations qui affectent la mécanique générale des tissus à base de collagène. Puisque le collagène est une protéine majeure de la structure des vaisseaux sanguins, sa la réticulation peut affecter les propriétés mécaniques des vaisseaux. Des expériences préliminaires nous ont permis de

suggérer une mécanique d'élongation très similaire sur des aortes prélevées chez des souris.

Malgré tout, la mesure des paramètres de ruptures, de rigidité et de relaxation dans la phase linéaire reflète qu'une partie de la mécanique physiologique des tissus à base de collagène puisque la région d'élongation normale se situe dans la phase « Toe » (BARBUCCI, ; HAMMER, 2007). Afin de comprendre la mécanique de la région « Toe », nous avons effectué différentes séries de mesures dans un régime de force inférieur à 1 MPa. Nous avons déterminé que l'aire sous la courbe du stress en fonction de l'élongation nominale représente l'énergie nécessaire à la déformation selon la surface axiale d'un tendon. L'énergie de déformation des tissus natifs est de $22 \pm 1 \text{ J/m}^2$ alors qu'elle passe à $43 \pm 2 \text{ J/m}^2$ suite à un traitement au glutaraldéhyde (Figure 16). On doit donc dépenser deux fois plus d'énergie pour déformer un tendon réticulé du même facteur qu'un tendon natif. Nathan *et al.* reporte une augmentation de l'énergie de rupture de tendons selon l'âge chez des rats (NATHAN *et al.*, 1978). À la lumière de tout cela, il est possible de concevoir que l'énergie de déformation représente la compliance qui est la capacité entre autre des vaisseaux à s'expandre en réponse à une augmentation de pression. En effet, dans le système sanguin, la compliance est la capacité des vaisseaux à se déformer par la pression sanguine. La diminution de la compliance augmente les risques d'hypertension. Hors, l'hypertension est l'une des complications majeures du diabète ((DOGGRELL, 2001; ZIEMAN *et al.*, 2004)). Les AGEs dans des cas d'hyperglycémie chronique comme le diabète peuvent donc causer une réticulation des tissus vasculaires et diminuer leur compliance ce qui augmente

l'incidence d'hypertension chez les diabétiques. De plus, l'énergie supplémentaire nécessaire à la déformation du tissu vasculaire est donnée par le cœur susceptible d'épuisement à long terme (DOGGRELL, 2001).

Afin de valider le modèle de réticulation de la phase « Toe », nous avons étudié le phénomène de déformation dans un système de glycation *in vitro* de tissus de collagène. De plus, puisque les élongations dans cette phase ne causent aucun changement irréversible, nous avons utilisé ce modèle comme système pour tester un agent briseur de réticulation. L'incubation des fibres de collagène dans de grandes concentrations de glucose augmente leur l'énergie de déformation de 46 % en moyenne (Figure 20). Un traitement subséquent au PTB (VASAN *et al.*, 1996), un agent briseur de réticulations causées par les AGEs, abaisse l'énergie de déformation de 35 % (Figure 20). Ceci nous permet de conclure sur deux points. Premièrement, puisque le PTB est spécifique à la réticulation causée par les AGEs, il y a donc formation de ces réticulations lorsque les tissus sont exposés au glucose. Deuxièmement, il est possible de renverser leurs effets par des interventions pharmacologiques. Par contre, le PTB est peu stable en solution aqueuse et son efficacité *in vivo* est continuellement remis en question (THORNALLEY *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 2003). Le développement de dérivé comme la ALT-711 est toutefois extrêmement prometteur et rétablie justement la compliance chez les patients atteint d'hypertension (KASS *et al.*, 2001).

Nous avons par ailleurs détecté la présence de AGEs sur ces fibres de collagène par immunofluorescence indirecte (Figure 19). Ceci nous permet une évaluation qualitative

de leur formation sur les tissus de collagène. Par contre, l'épitope majoritairement reconnu par l'anticorps est le CML qui n'est pas une structure de AGEs réticulante. Par contre, nous avons observé une résistance des tissus réticulés à la dénaturation. Ceux-ci demeurent intacts sur une période prolongée allant jusqu'à plusieurs mois alors que les tissus natifs se dégradent en un enchevêtrement de fibrilles. Nous pouvons donc supposer qu'il y a également formation de AGEs réticulants à travers les tissus traités au glucose ce qui maintient leur intégrité.

Nous voulions également déterminer l'impact de la réticulation sur les monomères de collagène. Avery *et al.* suggère que la réticulation des tissus de collagène se produit entre les monomères (AVERY *et al.*, 2006). Nous avons effectué de l'imagerie à haute résolution par microscopie à force atomique sur des fibres de collagène (Figure 21). Ceci nous a permis de percevoir des changements structuraux sur les fibrilles sous tension par l'augmentation de la périodicité du patron répétitif d'intervalles et de chevauchements (Figure 22). Cette structure particulière est issue de l'assemblage des monomères laissant des zones d'une densité plus élevée sur les chevauchements et plus faible sur les intervalles. L'augmentation de la périodicité se fait d'ailleurs principalement sur les intervalles à densité plus faible. De plus, la périodicité augmente en fonction de l'élongation appliquée sur l'échantillon. Les mesures de périodicités sur des fibres de collagène réticulées s'avèrent pour l'instant peu concluantes et demande une investigation plus approfondie. Par contre, nous avons clairement identifié l'importance du phénomène de l'expansion moléculaire dans la mécanique d'élongation des tissus de

collagène et particulièrement dans la phase « Toe » où l'élongation de sa structure correspond à l'élongation appliquée à l'échantillon.

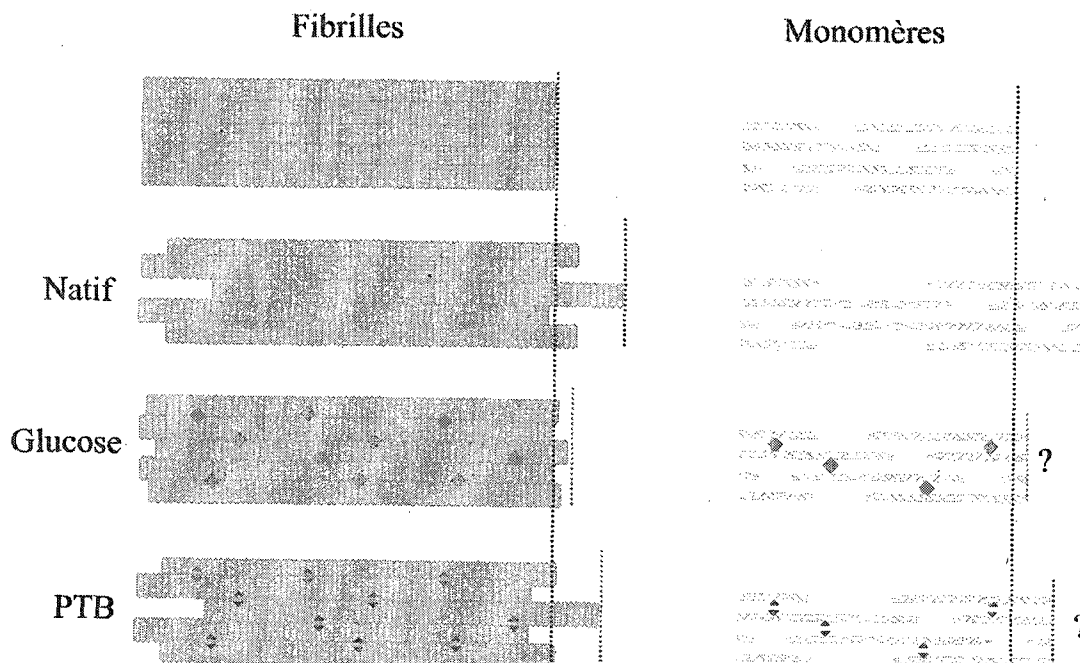


Figure 31 : La réticulation par les AGEs des différents niveaux de structures

Le phénomène de glissement est affecté par la réticulation des AGEs ♦ et peut être renversée par un traitement pharmacologique briseur de réticulation, le PTB ♦. L'effet de la réticulation reste à déterminer sur l'expansion moléculaire.

Dans le système vasculaire, l'endothélium représente la première barrière entre le sang et les tissus périphériques. Il est directement exposé aux molécules transportées par le sang tel le glucose. L'endothélium est donc susceptible de se subir de la glycation. Dans un second temps, nous voulions donc déterminer l'effet de l'exposition chronique à des concentrations pathologiques de glucose sur l'endothélium. En partant de l'hypothèse que le glucose peut causer des réticulations, nous avons effectué des mesures mécaniques sur des cellules endothéliales en cultures comme tissu modèle. Nous avons

tout d'abord évalué l'effet de la réticulation dans un système de réticulation positive au glutaraldéhyde. Avec la méthode de spectroscopie de force dérivée de l'AFM, nous sommes en mesure de mesurer la force nécessaire à la déformation de la membrane d'une cellule (Figure 23, a). Ces forces sont converties en module de Young selon le modèle mathématique de Hertz (RADMACHER *et al.*, 1996) (Figure 23, b). Nous déterminons le module de Young à 300 nm puisque nous voulons isoler la membrane des structures sous-jacentes tel le noyau tel que discuté par le group d'Oberleithner (OBERLEITHNER *et al.*, 2006). De plus, il était déterminé dans le laboratoire qu'une force appliquée à plus de 1 μm perce la membrane (CUERRIER *et al.*, 2007). Les modules de Young pour les cellules endothéliales reportés dans la littérature varient entre 0,1 et 6 kPa (STELTENKAMP *et al.*, 2006). De plus, la réticulation au glutaraldéhyde peut augmenter le module de Young à près de 20 kPa (STELTENKAMP *et al.*, 2006). Nous avons mesuré un module de Young de $1,057 \pm 0,031$ kPa sur nos cellules natives et une augmentation fulgurante à $4,726 \pm 0,383$ kPa après un traitement au glutaraldéhyde. La réticulation change donc la rigidité de la membrane des cellules endothéliales.

Nous avons par la suite procédé à des expériences d'exposition chronique au glucose sur les cellules endothéliales. Nous avons d'ailleurs contrôlé la présence de AGEs sur les cellules par immunofluorescence. Dans la figure 24 nous observons un marquage des AGEs beaucoup plus intense suite à l'exposition à de fortes concentrations de glucose. Par contre, l'épitope de l'anticorps est le CML qui n'est pas un AGEs réticulant. Il nous apparaît tout de même claire que les structures réticulantes peuvent aussi se former. L'immunofluorescence présente aussi l'opportunité de colocaliser différents marquages

fluorescents pour déterminer quelles sont les structures qui subissent la glycation. Puisque l'actine est un constituant majeur du cytosquelette, nous avons évalué sa localisation par rapport au AGEs. Les cellules sont donc aussi marquées à la phalloïdine Texas Red, agent de fixation du cytosquelette d'actine. Nous n'avons observé aucune corrélation entre les AGEs avec le cytosquelette d'actine ce qui suggère que la F-actine n'est pas une cible du glucose pour former des AGEs. Kueper *et al.* ont reporté qu'il n'y avait aucune glycation sur l'actine, mais ils indiquent la vimentine, une protéine des filaments intermédiaires, comme une cible majeure des AGEs dans des fibroblastes humain (KUEPER *et al.*, 2008; KUEPER *et al.*, 2007). Afin de déterminer quelles structures subissent la réticulation, il sera intéressant de vérifier la glycation de la vimentine dans notre ligné cellulaire suite à une exposition chronique à de fortes concentrations de glucose dans des travaux à venir.

Nous avons mesuré les changements de rigidités membranaires suite à l'exposition chronique à différentes concentrations de glucose par spectroscopie de force. On retrouve une rigidité membranaire augmentée par les mesures des modules de Young à $1,418 \pm 0,044$ kPa après une exposition à 40 mM de glucose et une augmentation à $1,572 \pm 58$ kPa à 80 mM de glucose si on les compare à $1,055 \pm 0,031$ kPa du groupe contrôle exposé à 5 mM. Par contre, nous n'avons pas évalué la rigidité des cellules endothéliales suite à un traitement au PTB puisque celui-ci induit une réponse mécanique des cellules. La réticulation par les AGEs pourrait donc être associée à des changements structuraux qui affectent la rigidité des cellules endothéliales. Ces modifications peuvent avoir d'importantes conséquences sur les fonctions des cellules endothéliales notamment dans

la microcirculation. À ce niveau la cellule endothéliale est la seule structure qui assure la circulation. La modification de sa rigidité peut grandement interférer avec les échanges sanguins.

Afin de valider nos observations de l'élévation de la rigidité par la réticulation des AGEs, nous avons identifié deux autres phénomènes qui modifient les propriétés mécaniques de la membrane. Dans un premier temps, Steltenkamp *et al.* rapportent qu'un accroissement de l'osmolarité augmente le module de Young des membranes (STELTENKAMP *et al.*, 2006). L'élévation de rigidité pourrait donc aussi être causée par une modification de l'osmolarité de 5 mM à 40 ou 80 mM de glucose. Pour contrôler cet effet, nous avons mesuré la rigidité des cellules endothéliales 3, 6, et 24 heures après un changement de milieu de 5 mM à 80 mM de glucose et nous n'avons observé aucun changement significatif de la rigidité des cellules. Suite à cette observation, nous avons déterminé que l'osmolarité n'est donc pas une cause de l'augmentation de la rigidité de nos cellules.

La seconde hypothèse porte sur une stimulation en continue du récepteur RAGE. En effet, plusieurs études montrent que l'effet de la liaison d'un ligand AGE au récepteur RAGE entraîne une série d'événement dont l'augmentation du stress oxydatif, ce qui modifie plusieurs éléments de la cellule et mène à des dysfonctions endothéliales (WAUTIER *et al.*, 2004). Pour examiner cette hypothèse nous avons vérifié l'expression du récepteur RAGE par la lignée de cellules endothéliales EAhy 926. Nous avons détecté différentes isoformes du récepteur, mais nous ne les avons pas identifiées (Figure 26). L'anticorps utilisé reconnaît la partie N-terminal donc il est possible de reconnaître

la forme dominante négative (dnRAGE) et la forme soluble (sRAGE) en plus de la forme complète du récepteur. Nous assumons que la forme complète est exprimée chez notre lignée cellulaire. Nous avons ensuite préparé deux agonistes AGEs différents soit le AGE-BSA et le AGE-BSA-Lys. Leur poids moléculaire a été évalué par migration différentielle sur SDS-PAGE (Figure 27). Nous avons déterminé un poids moléculaire de 65 kDa pour la BSA seule et une augmentation à 67 kDa pour le AGE-BSA et à 68 pour le AGE-BSA-Lys. L'albumine compte 61 lysines et 26 arginines. Thornalley rapporte la formation de AGE-BSA comptant jusqu'à 54 modifications dont la majorité sont des CML (THORNALLEY, 1998). Dans le AGE-BSA préparé, on peut évaluer à environ 40 modifications CML sur la structure de la BSA. De plus, nous supposons que le AGE-BSA forme plus de AGEs simples comme le CML et que l'ajout de lysine en solution provoque la formation de AGEs plus complexes comme le MOLD pour le AGE-BSA-Lys. À partir du poids moléculaire observé, le AGE-BSA-Lys peut contenir jusqu'à 18 modifications réticulantes MOLD. Nous avons confirmé la formation de AGEs complexes et fluorescent par autofluorescence (Figure 28). Il y a une augmentation de l'autofluorescence de AGE-BSA-Lys par rapport à AGE-BSA ce qui indique effectivement la présence de AGEs plus complexe possédant une autofluorescence. Par contre, nous n'avons pas observé la formation de dimères réticulés dans aucun des agonistes préparés. De plus, il serait possible de déterminer la nature de la complexité des structures par spectroscopie de masse.

Finalement, afin d'évaluer l'impact de la stimulation du récepteur RAGE sur le changement des propriétés mécaniques de la membrane des cellules endothéliales, nous

avons observé la réponse des cellules suite à une stimulation à divers agonistes AGEs (Figure 29). Les cellules stimulées au AGEs semblent réagir en se contractant. Ceci s'observe par l'augmentation de l'espace intercellulaire. Plusieurs études ont par ailleurs rapporté que la stimulation du récepteur RAGE augmentait la perméabilité endothéliale (ESPOSITO *et al.*, 1989; WAUTIER *et al.*, 1996). De plus, les cellules exposées à l'agoniste AGE-BSA se contractent beaucoup plus que celles stimulées par le AGE-BSA-Lys. Nous pensons que le AGE-BSA comporte beaucoup plus de CML qui est une structure physiologiquement active et reconnue par le récepteur (IKEDA *et al.*, 1996; REDDY *et al.*, 1995).

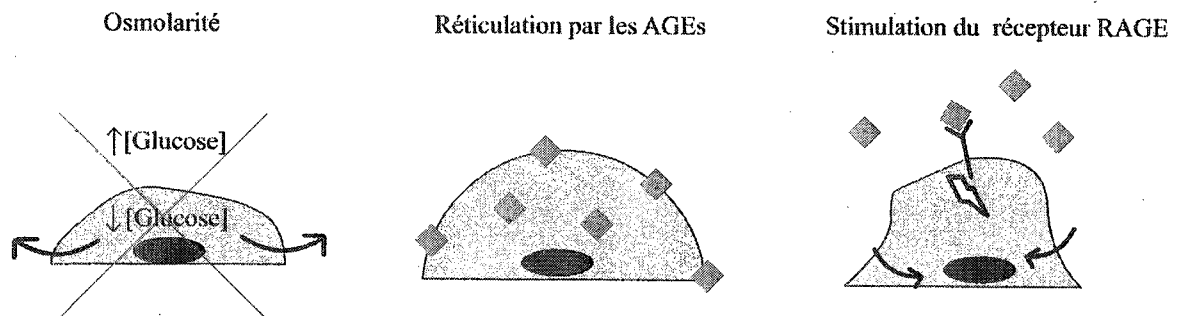


Figure 32 : Phénomènes pouvant affecter la rigidité membranaire

La réticulation par les AGEs ♦ de la membrane et d'autres éléments de la structure cellulaire comme le cytosquelette augmente la rigidité de la cellule, mais d'autres phénomènes comme l'activation du récepteur RAGE par les AGEs peuvent aussi entrer en jeux.

En perspective, il sera nécessaire d'identifier quelles structures cellulaires sont affectées par la réticulation des AGEs pour mieux comprendre les mécanismes de rigidification des cellules endothéliales. La vimentine a d'ailleurs été identifiée comme une cible des AGEs. Des expériences plus poussées en modulant l'expression de la vimentine, par

ARN interférence par exemple, pourraient répondre à cette question. Il faudra également effectuer des mesures de rigidité membranaire des cellules endothéliales suite à une stimulation par des agonistes AGEs. Il sera également intéressant d'identifier les voies de signalisations activées suite à la stimulation du récepteur RAGE impliquées dans la contraction des cellules endothéliales. Des expériences préliminaires par la technique de résonance de plasmons de surface nous indiquent des résultats similaires à nos observations par microscopie à contraste de phase. Cette méthode est par ailleurs beaucoup plus sensible et permet la mesure quantitative de ces mouvements membranaires. L'utilisation d'inhibiteurs des voies de signalisations connues du récepteur RAGE pourrait nous permettre d'interrompre la rigidification associée à la contraction des cellules endothéliales. De la même façon, l'utilisation d'antagonistes du récepteur RAGE comme l'héparine de faible poids moléculaire nous apportera des réponses importantes dans le contexte de la rigidité membranaire. L'étude de la formation des AGEs sur les cellules endothéliales suite à des traitements à l'aide d'inhibiteurs comme l'aminoguanidine ou d'agent briseur de réticulation comme le ALT-711 nous permettra d'évaluer l'évolution du phénomène de rigidification membranaire.

Pour les tissus de collagène, la prochaine étape est de passer à un niveau de complexité supérieur. Des expériences préliminaires sur des tissus vasculaires de souris nous montrent une mécanique très similaire. Des traitements réticulant, d'inhibiteurs ou briseurs des AGEs sur ces tissus vasculaires apporteront des éléments de réponses essentiels pour l'explication du phénomène de rigidification vasculaires. De plus, il sera

intéressant d'étudier les mécanismes moléculaires de la glycation entre autre par la mesure de l'expansion des monomères sous tension suite à des traitements réticulant par microscopie à force atomique.

7- Conclusion

En conclusion, nos résultats indiquent que les AGEs affectent les différentes structures biologiques qui composent les vaisseaux sanguins comme les cellules endothéliales et le collagène. Nous avons mesuré des changements biomécaniques de tissus de collagène et des cellules endothéliales. Nous avons observé que la réticulation modifie la mécanique des tissus de collagène. De plus, le glucose, par l'entremise de la glycation, peut-être la source de réticulations. Suite à ces études nous sommes en mesure de mieux comprendre la mécanique macroscopique des tissus de collagène et aussi la mécanique microscopique voir nanoscopique des fibres de collagène. Nous pouvons affirmer que l'impact des AGEs sur des fibres de collagène peut se refléter dans la dynamique globale d'un système comme les artères et les veines. La réticulation dans des cas pathologiques comme le diabète sont des causes directes de complications circulatoires. La réticulation par les AGEs cause une rigidification et une diminution de la compliance des vaisseaux. De plus, nous avons observé que les AGEs pouvaient également affecter l'endothélium. Leurs effets directs par la réticulation ou indirects par la signalisation du récepteur RAGE entraînent des changements structuraux qui peuvent affecter les fonctions des cellules endothéliales. Les dysfonctions endothéliales sont directement liées aux complications du diabète comme l'artériosclérose. Le changement de la rigidité cellulaire dans la microcirculation peut changer dramatiquement l'efficacité des échanges avec les tissus périphériques. L'intervention pharmacologique nous permettra dans le futur de prévenir ou de renverser ces effets néfastes peut-être un peu grâce à une meilleure compréhension de la mécanique des AGEs.

Remerciements

Je remercie mon directeur de recherche, le Dr Michel Grandbois pour m'avoir permis d'entreprendre mes études graduées au sein de son laboratoire, pour sa franchise, sa patience et pour son support, monétaire, académique, scientifique, et amical. Je le remercie pour m'avoir permis d'accomplir plus que ce que je n'avais jamais imaginé.

Je remercie les membres du laboratoire pour tous ces bons moments : Élie Simard, Réjean Lebel, Vincent Chabot, Raymond Hamel, Charles-Antoine Lamontagne, Gabriel Mitchell, Lahlou Iratène et John Graham. Les stagiaires Geneviève et Yahia qui ont contribué de près ou de loin à mes travaux. Un merci spécial à Charles Cuerrier pour son support essentielle à l'accomplissement de mes travaux.

J'aimerais remercier le Dr Abdelaziz Amrani et le Dr Pierre Lavigne pour leur générosité et pour avoir accepté de réviser mon mémoire de maîtrise.

Références

Amadori, M. (1925). *Atti Accad Naz Lincei*, vol. 2, p. 337.

Anonym, Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. (2003). *Diabetes Care*, vol. 26, p. S5-20.

Aronson, D. et Rayfield, E.J. (2002). How hyperglycemia promotes atherosclerosis: molecular mechanisms. *Cardiovasc.Diabetol.*, vol. 1, p. 1.

Atkinson, T.S., Ewers, B.J. et Haut, R.C. (1999). The tensile and stress relaxation responses of human patellar tendon varies with specimen cross-sectional area. *J.Biomech.*, vol. 32, p. 907-914.

Avery, N.C. et Bailey, A.J. (2006). The effects of the Maillard reaction on the physical properties and cell interactions of collagen. *Pathol.Biol.(Paris)*, vol. 54, p. 387-395.

Bailey, A.J. (2001). Molecular mechanisms of ageing in connective tissues. *Mech.Ageing Dev.*, vol. 122, p. 735-755.

Banting, F.G. and Best, C.H. (1922). *J. Lab. Clin. Med.*, vol. 7, p. 251-266.

Barbucci, R., *Integrated biomaterials science*. Springer, 1037 p.

- Basta, G., Lazzerini, G., Massaro, M., Simoncini, T., Tanganelli, P., Fu, C., Kislinger, T., Stern, D.M., Schmidt, A.M. et De Caterina, R. (2002). Advanced Glycation End Products Activate Endothelium Through Signal-Transduction Receptor RAGE: A Mechanism for Amplification of Inflammatory Responses. *Circulation*, vol. 105, p. 816-822.
- Basta, G., Schmidt, A.M. et De Caterina, R. (2004). Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc. Res.*, vol. 63, p. 582-592.
- Besin, G., Gaudreau, S., Menard, M., Guindi, C., Dupuis, G. et Amrani, A. (2008). Thymic Stromal Lymphopoietin and Thymic Stromal Lymphopoietin-Conditioned Dendritic Cells Induce Regulatory T-Cell Differentiation and Protection of NOD Mice Against Diabetes. *Diabetes*, vol. 57, p. 2107-2117.
- Bhatwadekar, V.S.G., (2005). Rapid method for the preparation of an AGE-BSA standard calibrator using thermal glycation. *J.Clin.Lab.Anal.*, vol. 19, p. 11-15.
- Bierhaus, A., Chevion, S., Chevion, M., Hofmann, M., Quehenberger, P., Illmer, T., Luther, T., Berentshtein, E., Tritschler, H., Muller, M., Wahl, P., Ziegler, R. et Nawroth, P.P. (1997). Advanced glycation end product-induced activation of NF-kappaB is suppressed by alpha-lipoic acid in cultured endothelial cells. *Diabetes*, vol. 46, p. 1481-1490.

- Bierhaus, A., Humpert, P.M., Stern, D.M., Arnold, B. et Nawroth, P.P. (2005). Advanced Glycation End Product Receptor-Mediated Cellular Dysfunction. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1043, p. 676-680.
- Bierhaus, A., Illmer, T., Kasper, M., Luther, T., Quehenberger, P., Tritschler, H., Wahl, P., Ziegler, R., Muller, M. et Nawroth, P.P. (1997). Advanced Glycation End Product (AGE)-Mediated Induction of Tissue Factor in Cultured Endothelial Cells Is Dependent on RAGE. *Circulation*, vol. 96, p. 2262-2271.
- Binnig, G., Quate, C. F. et Gerber, Ch. (1986). Atomic Force Microscope. *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, p. 930-933.
- Birchall, I.E., Lee, V.W. et Ketharanathan, V. (2001). Retention of endothelium on ovine collagen biomatrix vascular conduits under physiological shear stress. *Biomaterials*, vol. 22, p. 3139-3144.
- Brownlee, M., Cerami, A. et Vlassara, H. (1988). Advanced glycosylation end products in tissue and the biochemical basis of diabetic complications. *N.Engl.J.Med.*, vol. 318, p. 1315-1321.
- Brownlee, M., Pongor, S. et Cerami, A. (1983). Covalent attachment of soluble proteins by nonenzymatically glycosylated collagen. Role in the in situ formation of immune complexes. *J.Exp.Med.*, vol. 158, p. 1739-1744.
- Brownlee, M., Vlassara, H. et Cerami, A. (1985). Nonenzymatic glycosylation products on collagen covalently trap low-density lipoprotein. *Diabetes*, vol. 34, p. 938-941.

Brownlee, M., Vlassara, H., Kooney, A., Ulrich, P. et Cerami, A. (1986).

Aminoguanidine prevents diabetes-induced arterial wall protein cross-linking.

Science, vol. 232, p. 1629-1632.

Brownlee, M. (2001). Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications.

Nature, vol. 414, p. 813-820.

Bucala, R., Makita, Z., Vega, G., Grundy, S., Koschinsky, T., Cerami, A. et Vlassara, H.

(1994). Modification of low density lipoprotein by advanced glycation end products contributes to the dyslipidemia of diabetes and renal insufficiency.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., vol. 91, p. 9441-9445.

Bucala, R., Tracey, K.J. et Cerami, A. (1991). Advanced glycosylation products quench

nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes. *J.Clin.Invest.*, vol. 87, p. 432-438.

Bucala, R., Mitchell, R., Arnold, K., Innerarity, T., Vlassara, H. et Cerami, A. (1995).

Identification of the Major Site of Apolipoprotein B Modification by Advanced Glycosylation End Products Blocking Uptake by the Low Density Lipoprotein Receptor. *J.Biol.Chem.*, vol. 270, p. 10828-10832.

Bucciarelli, L.G., Wendt, T., Rong, L., Lalla, E., Hofmann, M.A., Goova, M.T., Taguchi,

A., Yan, S.F., Yan, S.D., Stern, D.M. et Schmidt, A.M. (2002). RAGE is a multiligand receptor of the immunoglobulin superfamily: implications for homeostasis and chronic disease. *Cell Mol.Life Sci.*, vol. 59, p. 1117-1128.

- Bunn, H. et Higgins, P. (1981). Reaction of monosaccharides with proteins: possible evolutionary significance. *Science*, vol. 213, p. 222-224.
- Butt, H.-. et Jaschke, M. (1995). Calculation of thermal noise in atomic force microscopy. *Nanotechnology*, vol. 6, p. 1-7.
- Carleton, S.M. et autres (2008). Role of genetic background in determining phenotypic severity throughout postnatal development and at peak bone mass in Col1a2 deficient mice (oim), Elsevier Science, 424681-694 p.
- Cuerrier, C.M., Lebel, R. et Grandbois, M. (2007). Single cell transfection using plasmid decorated AFM probes. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, vol. 355, p. 632-636.
- Dattilo, B.M., Fritz, G., Leclerc, E., VanderKooi, C.W., Heizmann, C.W. et Chazin, W.J. (2007). The Extracellular Region of the Receptor for Advanced Glycation End Products Is Composed of Two Independent Structural Units. *Biochemistry (N.Y.)*, vol. 46, p. 6957-6970.
- Ding, Q. et Keller, J.N. (2005). Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1746, p. 18-27.
- Doggrell, S.A. (2001). ALT-711 decreases cardiovascular stiffness and has potential in diabetes, hypertension and heart failure. *Expert Opin.Investig.Drugs*, vol. 10, p. 981-983.

Dyer, D.G., Dunn, J.A., Thorpe, S.R., Lyons, T.J., McCance, D.R. et Baynes, J.W.

(1992). Accumulation of Maillard reaction products in skin collagen in diabetes and aging. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 663, p. 421-422.

Edgell, C.J., McDonald, C.C. et Graham, J.B. (1983). Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization.

Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., vol. 80, p. 3734-3737.

Englert,C., Blunk, T., Muller, R., von Glasser, S., Baumer, J., Fierlbeck, J., Heid, I.,

Nerlich, M. and Hammer, J. (2007). Bonding of articular cartilage using a combination of biochemical degradation and surface cross-linking. *Arthritis Research & Therapy.*, vol. 9, p. 1478-6354.

Esposito, C., Gerlach, H., Brett, J., Stern, D. et Vlassara, H. (1989). Endothelial receptor-mediated binding of glucose-modified albumin is associated with increased monolayer permeability and modulation of cell surface coagulant properties.

J.Exp.Med., vol. 170, p. 1387-1407.

Federoff, H.J., Lawrence, D. et Brownlee, M. (1993). Nonenzymatic glycosylation of laminin and the laminin peptide CIKVAVS inhibits neurite outgrowth. *Diabetes*, vol. 42, p. 509-513.

Fotiadis, D., Scheuring, S., Muller, S.A., Engel, A. et Muller, D.J. (2002). Imaging and manipulation of biological structures with the AFM. *Micron*, vol. 33, p. 385-397.

Fratzl, P., Misof, K., Zizak, I., Rapp, G., Amenitsch, H. et Bernstorff, S. (1998). Fibrillar structure and mechanical properties of collagen. *J.Struct.Biol.*, vol. 122, p. 119-122.

- Freed, A.D. et Doebling, T.C. (2005). Elastic model for crimped collagen fibrils. *J.Biomech.Eng.*, vol. 127, p. 587-593.
- Fukami, K., Yamagishi, S., Ueda, S. et Okuda, S. (2008). Role of AGEs in diabetic nephropathy. *Curr.Pharm.Des.*, vol. 14, p. 946-952.
- Fulop, T., Tessier, D. et Carpentier, A. (2006). The metabolic syndrome. *Pathol.Biol.(Paris)*, vol. 54, p. 375-386.
- Gang CHENG, Li-li WANG, Wen-sheng QU, Long LONG, Hao CUI, Hong-ying LIU, Ying-lin CAO, Song LI, (2005). C16, a novel advanced glycation endproduct breaker, restores cardiovascular dysfunction in experimental diabetic rats¹. *Acta Pharmacol.Sin.*, vol. 26, p. 1460-1466.
- Genuth, S., Sun, W., Cleary, P., Sell, D.R., Dahms, W., Malone, J., Sivitz, W. et Monnier, V.M. (2005). Glycation and carboxymethyllysine levels in skin collagen predict the risk of future 10 year progression of diabetic retinopathy and nephropathy in the diabetes control and complications trial and epidemiology of diabetes interventions and complications participants with type 1 diabetes. *Diabetes*, vol. 54, p.3103-3111.
- Goldin, A., Beckman, J., Schmidt, A. et Creager, M. (2006). Advanced Glycation End Products: Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury. *Circulation*, vol. 114, p. 597-605.

- Graham, J.S., Vomund, A.N., Phillips, C.L. et Grandbois, M. (2004). Structural changes in human type I collagen fibrils investigated by force spectroscopy. *Exp. Cell Res.*, vol. 299, p. 335-342.
- Grandbois, M., Beyer, M., Rief, M., Clausen-Schaumann, H. et Gaub, H.E. (1999). How strong is a covalent bond? *Science*, vol. 283, p. 1727-1730.
- Grandbois, M., Dettmann, W., Benoit, M. et Gaub, H. (2000). Affinity Imaging of Red Blood Cells Using an Atomic Force Microscope. *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 48, p. 719-724.
- Greenwald, (2007). Ageing of the conduit arteries. *J.Pathol.*, vol. 211, p. 157-172.
- Hammer, W.I., (2007) *Functional Soft Tissue Examination and Treatment by Manual Methods*. Jones and Bartlett Publishers, 775 p.
- Harding, J.J. et Ganea, E. (2006). Protection against glycation and similar post-translational modifications of proteins. *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 1764, p. 1436-1446.
- Herrmann, K.L., McCulloch, A.D. et Omens, J.H. (2003). Glycated collagen cross-linking alters cardiac mechanics in volume-overload hypertrophy. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.*, vol. 284, p. H1277-1284.
- Hutter, J.L. et Bechhoefer, J. (1993). Calibration of atomic-force microscope tips. *Rev.Sci.Instrum.*, vol. 64, p. 1868-1873.

- Huttunen, H.J., Fages, C. et Rauvala, H. (1999). Receptor for Advanced Glycation End Products (RAGE)-mediated Neurite Outgrowth and Activation of NF-kappa B Require the Cytoplasmic Domain of the Receptor but Different Downstream Signaling Pathways. *J.Biol.Chem.*, vol. 274, p. 19919-19924.
- Ikeda, K., Higashi, T., Sano, H., Jinnouchi, Y., Yoshida, M., Araki, T., Ueda, S. et Horiuchi, S. (1996). Nε-(Carboxymethyl)lysine Protein Adduct Is a Major Immunological Epitope in Proteins Modified with Advanced Glycation End Products of the Maillard Reaction. *Biochemistry (N.Y.)*, vol. 35, p. 8075-8083.
- James, P.E., Lang, D., Tufnell-Barret, T., Milsom, A.B. et Frenneaux, M.P. (2004). Vasorelaxation by Red Blood Cells and Impairment in Diabetes: Reduced Nitric Oxide and Oxygen Delivery by Glycated Hemoglobin. *Circ.Res.*, vol. 94, p. 976-983.
- Jinn-Yuh Guh et autres (2001). Advanced glycation end product-induced proliferation in NRK-49F cells is dependent on the JAK2/STAT5 pathway and cyclin D1, W.B. Saunders, 3851096-1104 p.
- Johnstone, M.T. et A. Veves (2001). *Diabetes and Cardiovascular Disease*. Humana Press édition, 458 p.
- Kass, D.A., Shapiro, E.P., Kawaguchi, M., Capriotti, A.R., Scuteri, A., deGroof, R.C. et Lakatta, E.G. (2001). Improved Arterial Compliance by a Novel Advanced Glycation End-Product Crosslink Breaker. *Circulation*, vol. 104, p. 1464-1470.

Kenedi, R.M., Gibson, T., Evans, J.H. et Barbenel, J.C. (1975). Tissue mechanics.

Phys.Med.Biol., p. 699.

Kilhovd, B.K., Juutilainen, A., Lehto, S., Rönnemaa, T., Torjesen, P.A., Hanssen, K.F. et

Laakso, M. (2007). Increased serum levels of advanced glycation endproducts predict total, cardiovascular and coronary mortality in women with type 2 diabetes: a population-based 18 year follow-up study. *Diabetologia*, vol. 50, p. 1409–1417.

Kirstein, M., Aston, C., Hintz, R. et Vlassara, H. (1992). Receptor-specific induction of insulin-like growth factor I in human monocytes by advanced glycosylation end product-modified proteins. *J.Clin.Invest.*, vol. 90, p. 439-446.

Kirstein, M., Brett, J., Radoff, S., Ogawa, S., Stern, D. et Vlassara, H. (1990). Advanced protein glycosylation induces transendothelial human monocyte chemotaxis and secretion of platelet-derived growth factor: role in vascular disease of diabetes and aging. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 87, p. 9010-9014.

Kislinger, T., Fu, C., Huber, B., Qu, W., Taguchi, A., Du Yan, S., Hofmann, M., Yan, S.F., Pischetsrieder, M., Stern, D. et Schmidt, A.M. (1999). Nepsilon - (Carboxymethyl)Lysine Adducts of Proteins Are Ligands for Receptor for Advanced Glycation End Products That Activate Cell Signaling Pathways and Modulate Gene Expression. *J.Biol.Chem.*, vol. 274, p. 31740-31749.

Konova, E., Baydanoff, S., Atanasova, M. et Velkova, A. (2004). Age-related changes in the glycation of human aortic elastin. *Exp.Gerontol.*, vol. 39, p. 249-254.

- Kueper, T., Grune, T., Muhr, G.M., Lenz, H., Wittern, K.P., Wenck, H., Stab, F. et Blatt, T. (2008). Modification of vimentin: a general mechanism of nonenzymatic glycation in human skin. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 1126, p. 328-332.
- Kueper, T., Grune, T., Prahl, S., Lenz, H., Welge, V., Biernoth, T., Vogt, Y., Muhr, G., Gaemlich, A., Jung, T., Boemke, G., Elsasser, H., Wittern, K., Wenck, H., Stab, F. et Blatt, T. (2007). Vimentin Is the Specific Target in Skin Glycation: Structural prerequisites, functional consequences, and role in skin aging. *J.Biol.Chem.*, vol. 282, p. 23427-23436.
- Kuo, P.C., Kao, C.H. et Chen, J.K. (2007). Glycated type 1 collagen induces endothelial dysfunction in culture. *In Vitro Cell.Dev.Biol.Anim.*, vol. 43, p. 338-343.
- Lamontagne, C.A., Cuerrier, C.M. et Grandbois, M. (2008). AFM as a tool to probe and manipulate cellular processes. *Pflugers Arch.*, vol. 456, p. 61-70.
- Lander, H.M., Tauras, J.M., Ogiste, J.S., Hori, O., Moss, R.A. et Schmidt, A.M. (1997). Activation of the Receptor for Advanced Glycation End Products Triggers a p21ras-dependent Mitogen-activated Protein Kinase Pathway Regulated by Oxidant Stress. *J.Biol.Chem.*, vol. 272, p. 17810-17814.
- Li, J. et Schmidt, A.M. (1997). Characterization and Functional Analysis of the Promoter of RAGE, the Receptor for Advanced Glycation End Products. *J.Biol.Chem.*, vol. 272, p. 16498-16506.
- Maillard, L.C. and Gautier, M.A. (1912). *C R Seances Acad Sci III*, vol. 154, p. 66-68.

- Marieb, E.N. (1998) Anatomie et physiologie humaines 2e édition, Édition de Renouveau Pédagogique, 1194p.
- Meng, J. et autres (1998). Glycooxidation in aortic collagen from STZ-induced diabetic rats and its relevance to vascular damage, Elsevier, 1362355-365 p.
- Mitchell, G., Lamontagne, C., Lebel, R., Grandbois, M. et Malouin, F. (2007). Single-molecule dynamic force spectroscopy of the fibronectin-heparin interaction. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, vol. 364, p. 595-600.
- Miyata, T., Inagi, R., Iida, Y., Sato, M., Yamada, N., Oda, O., Maeda, K. et Seo, H. (1994). Involvement of beta 2-microglobulin modified with advanced glycation end products in the pathogenesis of hemodialysis-associated amyloidosis. Induction of human monocyte chemotaxis and macrophage secretion of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1. *J.Clin.Invest.*, vol. 93, p. 521-528.
- Monnier, V.M. et Cerami, A. (1983). Detection of nonenzymatic browning products in the human lens. *Biochim.Biophys.Acta*, vol. 760, p. 97-103.
- Musicki, B. et Burnett, A.L. (2007). Endothelial dysfunction in diabetic erectile dysfunction. *Int.J.Impot.Res.*, vol. 19, p. 129-138.
- Myint, K., Yamamoto, Y., Doi, T., Kato, I., Harashima, A., Yonekura, H., Watanabe, T., Shinohara, H., Takeuchi, M., Tsuneyama, K., Hashimoto, N., Asano, M., Takasawa, S., Okamoto, H. et Yamamoto, H. (2006). RAGE Control of Diabetic Nephropathy in a Mouse Model: Effects of RAGE Gene Disruption and Administration of Low-Molecular Weight Heparin. *Diabetes*, vol. 55, p. 2510-2522.

- Nathan, H., Goldgefter, L., Kobylansky, E., Goldschmidt-Nathan, M. et Morein, G. (1978). Energy absorbing capacity of rat tail tendon at various ages. *J.Anat.*, vol. 127, p. 589-593.
- Neeper, M., Schmidt, A., Brett, J., Yan, S., Wang, F., Pan, Y., Elliston, K., Stern, D. et Shaw, A. (1992). Cloning and expression of a cell surface receptor for advanced glycosylation end products of proteins. *J.Biol.Chem.*, vol. 267, p. 14998-15004.
- Neethling, W. M. L., A. J. Hodge, R. Glancy, (2003). Glutaraldehyde-fixed kangaroo aortic wall tissue: Histology, crosslink stability and calcification potential. vol. 66B, p. 356-363.
- Newkirk, M., Goldbach-Mansky, R., Lee, J., Hoxworth, J., McCoy, A., Yarboro, C., Klippel, J. et El-Gabalawy, H. (2003). Advanced glycation end-product (AGE)-damaged IgG and IgM autoantibodies to IgG-AGE in patients with early synovitis. vol. 5, p. R82.
- Oberleithner, H., Riethmuller, C., Ludwig, T., Shahin, V., Stock, C., Schwab, A., Hausberg, M., Kusche, K. et Schillers, H. (2006). Differential action of steroid hormones on human endothelium. *J.Cell.Sci.*, vol. 119, p. 1926-1932.
- Paulescu, N.C. (1921). Recherche sur le rôle du pancréas dans l'assimilation nutritive. *Arch Int Physiol*, vol. 17, p. 85-109.
- Provenzano, P., Lakes, R., Keenan, T. et Vanderby, R., Jr (2001). Nonlinear ligament viscoelasticity. *Ann.Biomed.Eng.*, vol. 29, p. 908-914.

- Provenzano, P.P. et Vanderby, R., Jr (2006). Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.*, vol. 25, p. 71-84.
- Quehenberger, P., Bierhaus, A., Fasching, P., Muellner, C., Klevesath, M., Hong, M., Stier, G., Sattler, M., Schleicher, E., Speiser, W. et Nawroth, P. (2000). Endothelin 1 transcription is controlled by nuclear factor-kappaB in AGE-stimulated cultured endothelial cells. *Diabetes*, vol. 49, p. 1561-1570.
- Radmacher, M., Fritz, M., Kacher, C.M., Cleveland, J.P. et Hansma, P.K. (1996). Measuring the viscoelastic properties of human platelets with the atomic force microscope. *Biophys.J.*, vol. 70, p. 556-567.
- Ranjan, M., Nayak, S. et Rao, B.S. (2006). Immunochemical detection of glycated beta- and gamma-crystallins in lens and their circulating autoantibodies (IgG) in streptozocin induced diabetic rat. *Mol. Vis.*, vol. 12, p. 1077-1085.
- Reddy, G.K. (2004a). AGE-related cross-linking of collagen is associated with aortic wall matrix stiffness in the pathogenesis of drug-induced diabetes in rats. *Microvasc. Res.*, vol. 68, p. 132-142.
- Reddy, G.K. (2004b). Cross-linking in collagen by nonenzymatic glycation increases the matrix stiffness in rabbit achilles tendon. *Exp. Diabetes Res.*, vol. 5, p. 143-153.
- Reddy, G.K., Stehno-Bittel, L. et Enwemeka, C.S. (2002). Glycation-induced matrix stability in the rabbit achilles tendon. *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 399, p. 174-180.

- Reddy, G.K. et autres (2001). The biomechanical integrity of bone in experimental diabetes, Elsevier Scientific Publishers, 5411-8 p.
- Reddy, S., Bichler, J., Wells-Knecht, K.J., Thorpe, S.R. et Baynes, J.W. (1995). N.epsilon.-(Carboxymethyl)lysine Is a Dominant Advanced Glycation End Product (AGE) Antigen in Tissue Proteins. *Biochemistry (N.Y.)*, vol. 34, p. 10872-10878.
- Rosenbloom, A.L., Silverstein, J.H., Riley, W.J. et Maclaren, N.K. (1983). Limited joint mobility in childhood diabetes: family studies. *Diabetes Care*, vol. 6, p. 370-373.
- Rousseau, E.P.M., Sauren, A.A.H.J., van Hout, M. C. et van Steenhoven, A. A. (1983). Elastic and viscoelastic material behaviour of fresh and glutaraldehyde-treated porcine aortic valve tissue. *J.Biomech.*, vol. 16, p. 339-341.
- Saika S. Somjee, Rajasekharan P. Warriar, Jessica L. Thomson, Jeannine Ory-Ascani, James M. Hempe, (2005). Advanced glycation end-products in sickle cell anaemia. *Br.J.Haematol.*, vol. 128, p. 112-118.
- Sajithlal, G.B., Chithra, P. et Chandrakasan, G. (1999). An in vitro study on the role of metal catalyzed oxidation in glycation and crosslinking of collagen. *Mol.Cell.Biochem.*, vol. 194, p. 257-263.
- Sakaguchi, T., Yan, S.F., Yan, S.D., Belov, D., Rong, L.L., Sousa, M., Andrassy, M., Marso, S.P., Duda, S., Arnold, B., Liliensiek, B., Nawroth, P.P., Stern, D.M., Schmidt, A.M. et Naka, Y. (2003). Central role of RAGE-dependent neointimal expansion in arterial restenosis. *J.Clin.Invest.*, vol. 111, p. 959-972.

- Sakata, N., Meng, J. et Takebayashi, S. (2000). Effects of advanced glycation end products on the proliferation and fibronectin production of smooth muscle cells. *J.Atheroscler.Thromb.*, vol. 7, p. 169-176.
- Sasaki, N., Fukatsu, R., Tsuzuki, K., Hayashi, Y., Yoshida, T., Fujii, N., Koike, T., Wakayama, I., Yanagihara, R., Garruto, R., Amano, N. et Makita, Z. (1998). Advanced Glycation End Products in Alzheimer's Disease and Other Neurodegenerative Diseases. *Am.J.Pathol.*, vol. 153, p. 1149-1155.
- Schmidt, A.M., Hori, O., Chen, J.X., Li, J.F., Crandall, J., Zhang, J., Cao, R., Yan, S.D., Brett, J. et Stern, D. (1995). Advanced glycation endproducts interacting with their endothelial receptor induce expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) in cultured human endothelial cells and in mice. A potential mechanism for the accelerated vasculopathy of diabetes. *J.Clin.Invest.*, vol. 96, p. 1395-1403.
- Schmidt, A.M., Yan, S.D., Yan, S.F. et Stern, D.M. (2001). The multiligand receptor RAGE as a progression factor amplifying immune and inflammatory responses. *J.Clin.Invest.*, vol. 108, p. 949-955.
- Schmidt, A., Mora, R., Cao, R., Yan, S., Brett, J., Ramakrishnan, R., Tsang, T., Simionescu, M. et Stern, D. (1994). The endothelial cell binding site for advanced glycation end products consists of a complex: an integral membrane protein and a lactoferrin- like polypeptide. *J.Biol.Chem.*, vol. 269, p. 9882-9888.

- Schmidt, A., Vianna, M., Gerlach, M., Brett, J., Ryan, J., Kao, J., Esposito, C., Hegarty, H., Hurley, W. et Clauss, M. (1992). Isolation and characterization of two binding proteins for advanced glycosylation end products from bovine lung which are present on the endothelial cell surface. *J.Biol.Chem.*, vol. 267, p. 14987-14997.
- Sell, D. et Monnier, V. (1989). Structure elucidation of a senescence cross-link from human extracellular matrix. Implication of pentoses in the aging process. *J.Biol.Chem.*, vol. 264, p. 21597-21602.
- Siebenlist, U., Franzoso, G. et Brown, K. (1994). Structure, Regulation and Function of NF-kappaB. *Annu.Rev.Cell Biol.*, vol. 10, p. 405-455.
- Simm, A. et autres (1997). Advanced glycation endproducts stimulate the MAP-kinase pathway in tubulus cell line LLC-PK1, Elsevier Science B.V, 4102481-484 p.
- Sims, T.J., Rasmussen, L.M., Oxlund, H. et Bailey, A.J. (1996). The role of glycation cross-links in diabetic vascular stiffening. *Diabetologia*, vol. 39, p. 946-951.
- Skamagas, TL Breen,D LeRoith, (2008). Update on diabetes mellitus: prevention, treatment, and association with oral diseases. *Oral Dis.*, vol. 14, p. 105-114.
- Steinbrecher, U. et Witztum, J. (1984). Glucosylation of low-density lipoproteins to an extent comparable to that seen in diabetes slows their catabolism. *Diabetes*, vol. 33, p. 130-134.
- Steltenkamp, S., Rommel, C., Wegener, J. et Janshoff, A. (2006). Membrane stiffness of animal cells challenged by osmotic stress. *Small*, vol. 2, p. 1016-1020.

- Stitt, A.W., Bucala, R. et Vlassara, H. (1997). Atherogenesis and advanced glycation: promotion, progression, and prevention. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, vol. 811, p. 115-27; discussion 127-9.
- Stitt, A.W. et Curtis, T.M. (2005). Advanced glycation and retinal pathology during diabetes. *Pharmacol.Rep.*, vol. 57 Suppl, p. 156-168.
- Sugaya, K., Fukagawa, T., Matsumoto, K., Mita, K., Takahashi, E., Ando, A., Inoko, H. et Ikemura, T. (1994). Three genes in the human MHC class III region near the junction with the class II: gene for receptor of advanced glycosylation end products, PBX2 homeobox gene and a notch homolog, human counterpart of mouse mammary tumor gene int-3. *Genomics*, vol. 23, p. 408-419.
- Sugimoto, K., Yasujima, M. et Yagihashi, S. (2008). Role of advanced glycation end products in diabetic neuropathy. *Curr.Pharm.Des.*, vol. 14, p. 953-961.
- Suzuki, D., Toyoda, M., Yamamoto, N., Miyauchi, M., Katoh, M., Kimura, M., Maruyama, M., Honma, M., Umezono, T. et Yagame, M. (2006). Relationship between the expression of advanced glycation end-products (AGE) and the receptor for AGE (RAGE) mRNA in diabetic nephropathy. *Intern.Med.*, vol. 45, p. 435-441.
- The Diabetes Control and Complications Trial Research Group, (1993). The Effect of Intensive Treatment of Diabetes on the Development and Progression of Long-Term Complications in Insulin-Dependent Diabetes Mellitus. *N.Engl.J.Med.*, vol. 329, p. 977-986.

- Thornalley, P.J. et Minhas, H.S. (1999). Rapid hydrolysis and slow alpha,beta-dicarbonyl cleavage of an agent proposed to cleave glucose-derived protein cross-links. *Biochem.Pharmacol.*, vol. 57, p. 303-307.
- Thornalley, P.J., Yurek-George, A. et Argirov, O.K. (2000). Kinetics and mechanism of the reaction of aminoguanidine with the alpha-oxoaldehydes glyoxal, methylglyoxal, and 3-deoxyglucosone under physiological conditions. *Biochem.Pharmacol.*, vol. 60, p. 55-65.
- Thornalley, P. (1998). Cell activation by glycated proteins. AGE receptors, receptor recognition factors and functional classification of AGEs. *Cell Mol Biol*, vol. 44, p. 1013-1024.
- Ulrich, P. et Cerami, A. (2001). Protein Glycation, Diabetes, and Aging. *Recent Prog.Horm.Res.*, vol. 56, p. 1-22.
- Uribarri, J., Stirban, A., Sander, D., Cai, W., Negrean, M., Buenting, C.E., Koschinsky, T. et Vlassara, H. (2007). Single Oral Challenge by Advanced Glycation End Products Acutely Impairs Endothelial Function in Diabetic and Nondiabetic Subjects. *Diabetes Care*, vol. 30, p. 2579-2582.
- Vasan, S., Foiles, P. et Founds, H. (2003). Therapeutic potential of breakers of advanced glycation end product-protein crosslinks. *Arch.Biochem.Biophys.*, vol. 419, p. 89-96.

- Vasan, S., Zhang, X., Zhang, X., Kapurniotu, A., Bernhagen, J., Teichberg, S., Basgen, J., Wagle, D., Shih, D., Terlecky, I., Bucala, R., Cerami, A., Egan, J. et Ulrich, P. (1996). An agent cleaving glucose-derived protein crosslinks in vitro and in vivo. *Nature*, vol. 382, p. 275-278.
- Verzijl, N., DeGroot, J., Thorpe, S.R., Bank, R.A., Shaw, J.N., Lyons, T.J., Bijlsma, J.W.J., Lafeber, F.P.J.G., Baynes, J.W. et TeKoppele, J.M. (2000). Effect of Collagen Turnover on the Accumulation of Advanced Glycation End Products. *J.Biol.Chem.*, vol. 275, p. 39027-39031.
- Viguet-Carrin, S., Garnero, P. et Delmas, P. (2006). The role of collagen in bone strength. *Osteoporosis Int.*, vol. 17, p. 319-336.
- Vitek, M.P., Bhattacharya, K., Glendening, J.M., Stopa, E., Vlassara, H., Bucala, R., Manogue, K. et Cerami, A. (1994). Advanced glycation end products contribute to amyloidosis in Alzheimer disease. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 91, p. 4766-4770.
- Vlassara, H. (1996). Advanced glycation end-products and atherosclerosis. *Ann.Med.*, vol. 28, p. 419-426.
- Vlassara, H., Brownlee, M., Manogue, K., Dinarello, C. et Pasagian, A. (1988). Cachectin/TNF and IL-1 induced by glucose-modified proteins: role in normal tissue remodeling. *Science*, vol. 240, p. 1546-1548.
- Vlassara, H., Striker, L.J., Teichberg, S., Fuh, H., Li, Y.M. et Steffes, M. (1994). Advanced glycation end products induce glomerular sclerosis and albuminuria in normal rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.*, vol. 91, p. 11704-11708.

- Wautier, J.L., Zoukourian, C., Chappey, O., Wautier, M.P., Guillausseau, P.J., Cao, R., Hori, O., Stern, D. et Schmidt, A.M. (1996). Receptor-mediated endothelial cell dysfunction in diabetic vasculopathy. Soluble receptor for advanced glycation end products blocks hyperpermeability in diabetic rats. *J.Clin.Invest.*, vol. 97, p. 238-243.
- Wautier, J. et Schmidt, A.M. (2004). Protein Glycation: A Firm Link to Endothelial Cell Dysfunction. *Circ.Res.*, vol. 95, p. 233-238.
- Wautier, M., Chappey, O., Corda, S., Stern, D.M., Schmidt, A.M. et Wautier, J. (2001). Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab.*, vol. 280, p. E685-694.
- Winlove, C.P., Parker, K.H., Avery, N.C. et Bailey, A.J. (1996). Interactions of elastin and aorta with sugars in vitro and their effects on biochemical and physical properties. *Diabetologia*, vol. 39, p. 1131-1139.
- Witztum, J.L. et Steinberg, D. (1991). Role of oxidized low density lipoprotein in atherogenesis. *J.Clin.Invest.*, vol. 88, p. 1785-1792.
- Yamagishi, S., Ueda, S., Matsui, T., Nakamura, K. et Okuda, S. (2008). Role of advanced glycation end products (AGEs) and oxidative stress in diabetic retinopathy. *Curr.Pharm.Des.*, vol. 14, p. 962-968.
- Yamamoto, H., Watanabe, T., Yamamoto, Y., Yonekura, H., Munesue, S., Harashima, A., Ooe, K., Hossain, S., Saito, H. et Murakami, N. (2007). RAGE in diabetic nephropathy. *Curr.Mol.Med.*, vol. 7, p. 752-757.

- Yamamoto, Y., Doi, T., et autres (2005). Receptor for Advanced Glycation End Products Is a Promising Target of Diabetic Nephropathy. vol. 1043, p. 562-566.
- Yan, S., Schmidt, A., Anderson, G., Zhang, J., Brett, J., Zou, Y., Pinsky, D. et Stern, D. (1994). Enhanced cellular oxidant stress by the interaction of advanced glycation end products with their receptors/binding proteins. *J.Biol.Chem.*, vol. 269, p. 9889-9897.
- Yan, S.F., Ramasamy, R., Naka, Y. et Schmidt, A.M. (2003). Glycation, Inflammation, and RAGE: A Scaffold for the Macrovascular Complications of Diabetes and Beyond. *Circ.Res.*, vol. 93, p. 1159-1169.
- Yang, S., Litchfield, J.E. et Baynes, J.W. (2003). AGE-breakers cleave model compounds, but do not break Maillard crosslinks in skin and tail collagen from diabetic rats. *Arch.Biochem.Biophys.*, vol. 412, p. 42-46.
- Yoshioka, S.A. et Goissis, G. (2008). Thermal and spectrophotometric studies of new crosslinking method for collagen matrix with glutaraldehyde acetals. *J.Mater.Sci.Mater.Med.*, vol. 19, p. 1215-1223.
- Yurchenco, P.D. (1994). *Extracellular matrix assembly and structure*. Academic Press édition, 462 p.
- Zhou, Z., Wang, K., Penn, M.S., Marso, S.P., Lauer, M.A., Forudi, F., Zhou, X., Qu, W., Lu, Y., Stern, D.M., Schmidt, A.M., Lincoff, A.M. et Topol, E.J. (2003). Receptor for AGE (RAGE) Mediates Neointimal Formation in Response to Arterial Injury. *Circulation*, vol. 107, p. 2238-2243.

- Zieman, S.J. et Kass, D.A. (2004). Advanced glycation endproduct crosslinking in the cardiovascular system: potential therapeutic target for cardiovascular disease. *Drugs*, vol. 64, p. 459-470.
- Zlatanova, J., Lindsay, S.M. et Leuba, S.H. (2000). Single molecule force spectroscopy in biology using the atomic force microscope. *Prog.Biophys.Mol.Biol.*, vol. 74, p. 37-61.